



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

A RT – qPCR como ferramenta de diagnóstico da infecção
por *Pneumocystis jirovecii*

Maria da Conceição Baleia Carvalho

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

OUTUBRO, 2014



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**A RT – qPCR como ferramenta de diagnóstico da infecção
por *Pneumocystis jirovecii***

Autor: Maria da Conceição Baleia Carvalho

Orientador: Professora Doutora Olga Matos

Coorientador: Doutor Francisco Esteves

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

PUBLICAÇÕES

A partir do conjunto de alguns dos resultados obtidos no decorrer desta dissertação, foram apresentados os seguintes trabalhos:

CARVALHO, M.C. ESTEVES, F. GALZERANO, A. MATOS, O. (2013) Importância da colonização por *Pneumocystis jirovecii* nos doentes HIV-negativos com doença pulmonar obstrutiva crónica, neoplasias, outras pneumonias e transplantados. 1º Encontro Ibero-americano e dos Países de Língua Oficial Portuguesa – *Pneumocystis* e Pneumocistose, Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

CARVALHO, M.C. ESTEVES, F. GALZERANO, A. MATOS, O. (2014) High frequency of patients colonized by *Pneumocystis jirovecii* in a community central hospital in Lisbon, Portugal. 13th International Workshop on Opportunistic Protists – IWOP 2014, Sevilla, Spain.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Olga Matos, orientadora da presente tese, agradeço a confiança depositada no meu projecto, as oportunidades que me proporcionou, e a disponibilidade e simpatia sempre demonstrada.

Ao Doutor Francisco Esteves, coorientador, pelo apoio prestado e por toda a paciência.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO), na pessoa da sua Directora, Dra. Sância Ramos, por me ter propiciado condições à realização deste estudo.

Às colegas com quem trabalho no sector da Citopatologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Egas Moniz – CHLO, que colaboraram na recolha das amostras biológicas para o estudo, bem como pelo apoio e paciência; um especial agradecimento à Cláudia Linares e Diamantina Vasconcelos. Ao Dr. António Galzerano, pelo apoio prestado na recolha dos dados clínicos dos doentes, e à Dra. Martinha Chorão, que teve a paciência de ler e criticar o trabalho.

À minha colega e amiga do VI Mestrado de Ciências Biomédicas, Andreia Albuquerque, pela partilha de conhecimentos e por todo o apoio prestado, inclusivamente em actividades paralelas.

À Doutora Luísa Lobo e ao Doutor Fernando Cardoso, da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica (UEIPM) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL), pelo apoio e boa disposição.

A todos os meus amigos e porque não posso deixar de particularizar, à Lúcia Rodrigues, pelo apoio, incentivo e amizade.

À minha família, pelo carinho e apoio constante e incondicional, por vós, tudo...

RESUMO

Pneumocystis jirovecii é um importante agente oportunista responsável por uma das mais severas infecções respiratórias em doentes imunocomprometidos, designada por pneumonia por *Pneumocystis* (PPc). Embora a PPc esteja associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), o número de casos de PPc e portadores assintomáticos de *P. jirovecii* tem vindo a aumentar entre os doentes seronegativos para VIH com outras imunodeficiências. Nas últimas décadas, técnicas moleculares têm permitido a detecção de baixas cargas parasitárias de *P. jirovecii*, geralmente não detectáveis pelos métodos microscópicos clássicos.

O objectivo deste estudo foi determinar a frequência da infecção por *P. jirovecii* em doentes Portugueses seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência, e seropositivos para VIH, de um hospital central comunitário de Lisboa, utilizando metodologias moleculares.

Um total de 300 amostras respiratórias foram obtidas a partir de 274 (91,3%) doentes seronegativos para VIH e 26 (8,7%) seropositivos para VIH. Dos 274 seronegativos para VIH, as condições clínicas subjacentes incluem: 139 neoplasias, 45 doenças pulmonares obstrutivas crónicas (DPOC), 37 pneumonias (não PPc), 17 tuberculoses, 16 doenças autoimunes, nove transplantados de órgão sólido e 11 com outras causas. Dos 26 doentes seropositivos para VIH, 10 apresentavam suspeita clínica da PPc e os restantes 16, outras causas clínicas.

Todas as amostras foram estudadas por PCR em tempo real (RT-qPCR) tendo como alvo o gene nuclear de cópia única de *P. jirovecii* que codifica a protease serina *Kexin* (*KEX1*), e por *nested*-PCR dirigida ao gene mitocondrial multicópia que codifica a subunidade grande do rRNA (*mtLSU rRNA*) de *P. jirovecii*.

DNA de *P. jirovecii* foi detectado em 119 (39,7%) doentes da população estudada (98, 35,8% seronegativos para VIH; 21, 80,8% seropositivos para VIH); 51 (36,7%) neoplasias, 20 (44,4%) DPOC, 9 (24,3%) pneumonias (não PPc), uma (5,9%) tuberculose, cinco (31,2%) doenças autoimunes, 8 (88,9%) transplantados de órgão sólido e quatro (36,4%) de outras causas. Entre os doentes seropositivos para VIH, DNA de *P. jirovecii* foi detectado em 10 (100%) com suspeita clínica de PPc e em 11 (68,8%) dos doentes com outras causas. Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre os seronegativos para VIH submetidos a transplante de órgão sólido ($P = 0.003$) e os seropositivos para VIH ($P < 0.001$) e a presença de DNA de *P. jirovecii*. A técnica de RT-qPCR detectou 55 amostras positivas (18,3%), e a *nested*-PCR 108 (36%). Uma concordância de resultados foi observada em 225 (75%) amostras. A RT-qPCR demonstrou uma especificidade de 94,3% e sensibilidade de 40,7%, com um valor preditivo positivo de 80%, tendo a *nested*-PCR como referência padrão. Verificou-se que, os valores de C_T mais baixos corresponderam ao grupo dos doentes seronegativos para VIH submetidos a transplante de órgão e seropositivos para VIH sintomáticos para PPc. Este trabalho confirma a importância da colonização por *P. jirovecii* nos doentes seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência e seropositivos para VIH em ambiente hospitalar. Esta população encontra-se em risco de desenvolver PPc ou de transmitir o agente patogénico a outros doentes susceptíveis, e desempenhar um papel importante na circulação e transmissão de *P. jirovecii* na comunidade.

Palavras-chave: *Pneumocystis jirovecii*, seronegativos para VIH, colonização, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Pneumocystis jirovecii is an important opportunistic agent that causes one of the most severe respiratory infections in immunocompromised patients, known as *Pneumocystis* pneumonia (PcP). Although PcP is commonly associated with HIV infection, the numbers of PcP cases and *P. jirovecii* asymptomatic carriers are increasing among HIV seronegative patients with other predisposing immunodeficiencies. In the last decades, molecular techniques have allowed the detection of very low burdens of *P. jirovecii*, usually not detectable by the classic microscopic methods.

The aim of this study was to determine the frequency of *P. jirovecii* infection in HIV seronegative and seropositive Portuguese patients from a community central hospital in Lisbon, using molecular approaches.

A total of 300 respiratory specimens were obtained from 274 (91.3%) HIV seronegative and 26 (8.7%) HIV seropositive patients. Of the 274 HIV seronegative patients, underlying medical conditions included: 139 malignancies, 45 chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), 37 pneumonias (not PcP), 17 tuberculosis (TB), 16 autoimmune diseases, nine solid-organ transplantation and 11 other causes. Of the 26 HIV seropositive patients, 10 had clinical suspicion of PcP and the remaining 16, other medical causes.

All samples were analyzed by real-time PCR (RT-qPCR) targeting the *P. jirovecii* nuclear single-copy kexin-like serine protease (*KEX1*) gene and by nested-PCR directed to the *P. jirovecii* mitochondrial multicopy large-subunit rRNA (*mtLSU rRNA*) gene.

The analysis of the results, indicate that *P. jirovecii* DNA was detected in 119 (39.7%) patients of the studied population (98, 35.8% HIV seronegative; 21, 80.8% HIV seropositive); 51 (36.7%) malignancies, 20 (44.4%) COPD, nine (24.3%) pneumonias (not PcP), one (5.9%) TB, five (31.2%) autoimmune diseases, eight (88.9%) solid-organ transplantation and four (36.4%) other causes. Among the HIV seropositive patients, *P. jirovecii* DNA was detected in 10 (100%) with clinical suspicion of PcP and 11 (68.8%) of patients with other causes. There was a statistically significant association between solid-organ transplantation HIV seronegative ($P = 0,003$) patients and HIV positive ($P < 0.001$) patients and the presence of *P. jirovecii* DNA. The RT-qPCR assay detected 55 positive samples (18.3%), whereas the nested-PCR assay detected 108 positives ones (36%). A concordance of results was observed in 225 (75%) samples. The RT-qPCR showed a specificity of 94.3% and sensitivity of 40.7%, with a positive predictive valor of 80%, using the nested-PCR as reference standard. The lowest C_T values corresponded to HIV seronegative patients undergoing organ transplantation, and HIV seropositive patients symptomatic for PcP.

This work confirms the importance of the HIV seronegative (with other predisposing immunodeficiency) and HIV seropositive patients colonized by *P. jirovecii* in a hospital environment. This population is at risk of developing PcP or may transmit the pathogen to other susceptible patients, and may play an important role in the circulation and transmission of the organisms in the community.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, HIV negative, colonization, real-time PCR.

ÍNDICE GERAL

PUBLICAÇÕES	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE QUADROS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS	xv
INTRODUÇÃO	1
1.1 Referência histórica	3
1.2 Taxonomia	6
1.3 Caracterização do género <i>Pneumocystis</i>	10
1.3.1 Características morfológicas	10
1.3.2 Ciclo de vida	12
1.4 Epidemiologia da infecção por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	15
1.4.1 Frequência e distribuição geográfica	15
1.4.2 Transmissão	18
1.4.2.1 Modo de infecção	19
1.4.2.2 Colonização por <i>P. jirovecii</i>	23
1.5 Enquadramento clínico do <i>P. jirovecii</i> nos humanos	28
1.5.1 Apresentação e importância clínica	28
1.5.2 Patologia e patogénese	30
1.5.3 Pneumonia por <i>P. jirovecii</i>	33
1.6 Diagnóstico da pneumonia por <i>P. jirovecii</i>	36
1.6.1 Diagnóstico presuntivo	36
1.6.2 Diagnóstico definitivo	37
1.6.2.1 Amostras biológicas	38
1.6.2.2 Métodos laboratoriais tradicionais de diagnóstico	41
1.6.2.3 Métodos moleculares de diagnóstico	44
1.7 Tratamento e Profilaxia	48

OBJECTIVOS	52
MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Caracterização da população em estudo	55
2.2 Processamento das amostras biológicas	56
2.2.1 Expectoração espontânea e secreção brônquica	56
2.2.2 Lavado broncoalveolar e escovado brônquico	56
2.3 Detecção molecular de <i>P. jirovecii</i>	56
2.3.1 Extração de DNA genómico	57
2.3.2 Amplificação do <i>locus mtLSU rRNA</i> pela <i>nested-PCR</i>	59
2.3.3 Amplificação do <i>locus KEX1</i> por RT-qPCR.	61
2.3.4 Análise dos dados	66
RESULTADOS	67
3.1 Características demográficas e clínicas da população em estudo	69
3.2 Diagnóstico molecular	74
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Carlos Chagas	3
Figura 2. Árvore filogenética do género <i>Pneumocystis</i> , demonstrando as cinco espécies a partir da análise de sequências nucleotídicas	9
Figura 3. Representação das principais estruturas celulares das morfologias de <i>Pneumocystis</i>	10
Figura 4. Representação do ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i> spp.	13
Figura 5. Imagens de microscopia electrónica – Trofozoíto e Préquisto	31
Figura 6. Distribuição do número de casos de doentes seropositivos para VIH na União Europeia, pelas três principais doenças associadas e segundo três modos de transmissão	35
Figura 7. Identificação microscópica de formas morfológicas de <i>Pneumocystis</i> em amostras respiratórias, utilizando diferentes técnicas de coloração	42
Figura 8. Identificação microscópica de quistos de <i>P. jirovecii</i> em SB pela técnica de PAP	43
Figura 9. Identificação microscópica de quistos de <i>P. jirovecii</i> em LBA pela técnica de IFI	44
Figura 10. Representação esquemática da extracção de DNA	58
Figura 11. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação pela técnica de <i>nested</i> -PCR	61
Figura 12. Princípio de funcionamento das sondas <i>TaqMan</i> ®	63
Figura 13. Imagem do termociclador da <i>Applied Biosystems</i>	63
Figura 14. Imagem do programa do termociclador da <i>Applied Biosystems</i>	64
Figura 15. Curvas de amplificação de duas amostras com quantidades diferentes de DNA	66
Figura 16. Distribuição das idades dos doentes estudados pelos grupos etários definidos	70
Figura 17. Distribuição do número de doentes pelos grupos etários, quanto ao género e à condição de VIH	71
Figura 18. Distribuição do número de doentes por condição clínica e pelo tipo de amostra biológica	73

Figura 19. Distribuição dos resultados obtidos quanto à presença de infecção por <i>P. jirovecii</i> nos diferentes grupos etários	75
Figura 20. Comparação dos resultados obtidos pela técnica de RT-qPCR e <i>nested</i> -PCR quanto às diversas condições clínicas dos doentes	80
Figura 21. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C _T , quanto ao tipo de amostra respiratória	82
Figura 22. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C _T , quanto à condição de VIH	83
Figura 23. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C _T , pelas diferentes condições clínicas em estudo	84
Figura 24. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C _T , pelos doentes assintomáticos e sintomáticos para PPc	86

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Nomenclatura trinomial para <i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. em função do hospedeiro	8
Quadro 2. Factores de risco de colonização por <i>Pneumocystis</i>	24
Quadro 3. Tipo de amostras utilizadas no diagnóstico da PPc, referências bibliográficas e respectivas percentagens de detecção	39
Quadro 4. Características dos <i>primers</i> utilizados na <i>nested</i> -PCR para amplificação do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i>	59
Quadro 5. Condições térmicas aplicadas nas duas etapas da <i>nested</i> -PCR para amplificação do gene <i>mtLSU rRNA</i> de <i>P. jirovecii</i>	60
Quadro 6. Características dos <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR para amplificação do gene <i>KEX1</i> de <i>P. jirovecii</i>	62
Quadro 7. Condições térmicas e ciclos aplicadas na técnica RT-qPCR	65
Quadro 8. Distribuição das idades dos doentes por grupos etários, de acordo com o género e quanto à infecção por VIH	70
Quadro 9. Distribuição dos doentes em grupos e subgrupos pela condição clínica e pelo tipo de amostra biológica recolhida	72
Quadro 10. Distribuição dos resultados quanto à presença de infecção por <i>P. jirovecii</i> , por género e tipo de amostra biológica	74
Quadro 11. Associação entre condição clínica dos doentes e a presença de infecção por <i>P. jirovecii</i>	76
Quadro 12. Comparação entre os resultados obtidos pela técnica de RT-qPCR e <i>nested</i> -PCR	78
Quadro 13. Distribuição dos resultados obtidos por ambas as técnicas de PCR, pelo tipo de amostras biológicas analisadas e condições clínicas da população em estudo	79
Quadro 14. Distribuição dos resultados obtidos pela técnica de RT-qPCR, expressos em C _T , quanto ao tipo de amostra biológica e condição clínica de cada doente	81
Quadro 15. Comparação dos valores de C _T , segundo o tipo de amostra respiratória	82
Quadro 16. Comparação dos valores de C _T , segundo a condição de VIH	83

Quadro 17. Comparação dos valores de C_T , segundo as diferentes condições clínicas dos doentes	85
Quadro 18. Comparação dos valores de C_T , quanto ao quadro clínico de PPc	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amónia
5'→3'	Sentido de orientação da sequência nucleotídica
18S rRNA	Subunidade pequena do RNA ribossómico
Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo monoclonal
AdoMet	S-adenosilmetionina, do inglês <i>S-adenosylmethionine</i>
Ag	Antigénio
β	Beta
β-TUB	β-tubulina
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
BTB	Biópsia transbrônquica
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDSC	<i>Communiabile Disease Surveillance Center</i>
CHLO	Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
C_T	<i>Cycle threshold</i>
DHFR	Dihidrofolato reductase
DHPS	Dihidrofolato sintetase
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados, do inglês <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EB	Escovado brônquico
EE	Expectoração espontânea
EI	Expectoração induzida
et al.	“E outros”, do latim <i>et alii</i>

EUA	Estados Unidos da América
g	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
g	Grama
FAM	Fluoresceína amidite, do inglês <i>fluorescein amidite</i>
GMS	Coloração pela metenamina prata, do inglês <i>gomori methenamine-silver</i>
HCL	Ácido clorídrico
HEM	Hospital de Egas Moniz
ICNB	<i>Internacional Code of Botanical Nomenclature</i>
IF	Imunofluorescência
IFI	Imunofluorescência indireta
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
ITS	Espaçadores internos transcritos, do inglês <i>internal transcribed spacer</i>
KEX1	Protease serina <i>Kexin</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Desidrogenase láctica, do inglês <i>lactate dehydrogenase</i>
m	Massa
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
mRNA	RNA mensageiro
MSG	Glicoproteína <i>major</i> de superfície, do inglês <i>major surface glycoprotein</i>
mtLSU rRNA	Subunidade grande do RNA ribossômico mitocondrial, do inglês <i>mitochondrial large-subunit rRNA</i>

mtSSU rRNA	Subunidade pequena do RNA ribossômico mitocondrial, do inglês <i>mitochondrial small-subunit rRNA</i>
<i>n</i>	Número de indivíduos
nm	Nanómetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P</i>	Probabilidade
<i>P</i> < 0.05	Nível de significância inferior a 0.05
PaO₂	Pressão parcial de oxigénio arterial
P(Aa)O₂	Gradiente oxigénio arterial-alveolar
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês <i>polimerase chain reaction</i>
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração de iões de hidrogénio de uma solução (-log [H ⁺])
PPc	Pneumonia por <i>Pneumocystis</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
rRNA	RNA ribossômico, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	PCR em tempo real, do inglês <i>real-time PCR</i>
SB	Secreção brônquica
Sida	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
SK	Sarcoma de Kaposi
SMZ	Sulfametoxazol
spp.	Espécie
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TARVc	Terapêutica antirretrovírica de combinação
TB	Tuberculose
TBO	Coloração de azul de toluidina, do inglês <i>toluidine-blue O</i>
T CD4⁺	Linfócito T com receptores de agrupamento de diferenciação 4
T CD8⁺	Linfócito T com receptores de agrupamento de diferenciação 8
TMP	Trimetoprim

TNF-α	Factor de necrose tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetilo)aminometano
TS	Timidilato sintetase
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
U	Unidade
UDG	Uracilo-DNA Glicosidase
UEIPM	Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica
UNL	Universidade Nova de Lisboa
UV	Ultravioleta
v	Volume
V	Volts
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
VIH-	Seronegativo para VIH
VIH+	Seropositivo para VIH
χ^2	Qui-quadrado

INTRODUÇÃO

1.1 Referência histórica

O estudo científico do género *Pneumocystis* teve início no Brasil, onde Carlos Chagas (**Figura 1**) descobriu pela primeira vez a sua forma quística, em 1909 (Aliouat-Denis *et al.* 2009), nos pulmões de cobaias que haviam sido inoculadas com sangue de crianças com tripanossomíase e concluiu, erroneamente, tratar-se de uma nova forma de um estágio do ciclo de vida de *Trypanossoma cruzi* (Chagas 1909).



Figura 1. Carlos Chagas (www.fioCruz.br)

Um ano mais tarde (1910), António Carini, Director do Instituto Pasteur em São Paulo, no Brasil, identificou quistos similares nos pulmões de ratos infectados por *Trypanossoma lewisi* (Carini 1910). Só em 1912, no Instituto Pasteur em Paris, o casal Delanoë concluiu que se estava perante uma nova entidade biológica (Delanoë & Delanoë 1912), não apenas pela análise das amostras de tecido pulmonar enviadas por Carini, mas também pela sua identificação em amostras de pulmão de ratos sem infecção por *Trypanossoma*. Assim sendo, propuseram a designação de *Pneumocystis carinii*. *Pneumo* pelo tropismo que apresenta para os pulmões, *cystis* à sua forma típica quística descoberta, e *carinii* em homenagem ao biólogo italiano, António Carini (Calderón *et al.* 2002; Thomas & Limper 2004; Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Em 1942 Van Der Meer e Brug observaram pela primeira vez que o microrganismo afectava também o homem (Van Der Meer & Brug 1942). Este achado, manteve-se relativamente desconhecido até ao início da década de cinquenta, quando Vanek (Vanek 1951) e Jirovec (Jirovec 1952), na Checoslováquia e na Alemanha, respectivamente, verificaram que determinadas pneumonias intersticiais, que surgiam

como surtos em crianças desnutridas e em doentes com infecções hospitalares, eram desencadeadas por *P. carinii*, demonstrando assim que o parasita, ao contrário do que se pensava até então, não só infectava animais como igualmente o homem, causando doença (Vanek 1951; Jirovec 1952).

Durante muitos anos *P. carinii* não teve especial importância médica e foi pouco estudado, tendo sido considerado um protozoário em virtude da sua semelhança morfológica, da patologia associada, da resposta a antiprotozoários, da ausência de algumas características fenotípicas dos fungos, bem como pela incapacidade de se desenvolver em meios de cultura laboratoriais (Stringer 1996). No entanto, dois tipos de observações foram responsáveis por relevantes alterações que levaram à inclusão de *P. carinii* entre os microrganismos mais importantes e estudados dos últimos anos. Um dos tipos, clínico, relaciona-se com o acentuado número de casos de pneumonia intersticial em crianças debilitadas, sobretudo prematuras e desnutridas na Europa Central e Ocidental durante e após a II Guerra Mundial (Hughes 2001; Kovacs *et al.* 2001; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002). Durante os anos sessenta, *P. carinii* era reconhecido como o principal agente patogénico pulmonar oportunista, causando pneumonia severa em crianças com imunodeficiência primária e em doentes sob imunossuppressores para o tratamento de cancro e no transplante de órgãos (Walzer *et al.* 1974; Stringer 1996). A importância da infecção por *Pneumocystis* aumentou substancialmente na década de oitenta, com o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (sida), sendo este microrganismo a maior causa de infecção oportunista e morte. Mais de 90% de doentes com sida desenvolviam pneumocistose (Frenkel *et al.* 1966; Mills 1986). O outro tipo, com base em estudos ultraestruturais, não confirmou a existência de elementos na constituição do *P. carinii* característicos dos protozoários. Em 1988, a sequência da subunidade pequena do ribossoma de *P. carinii* (16S-like rRNA) foi determinada e, surpreendentemente, revelou-se similar às dos fungos (Edman *et al.* 1988, 1989b; Stringer *et al.* 1989a, 1989b). Estudos subsequentes das sequências de genes mitocondriais, de genes que codificam proteínas e enzimas importantes, vieram demonstrar que *P. carinii* pertence ao Reino dos fungos (Edman *et al.* 1988; Ypma-Wong *et al.* 1992; Cushion *et al.* 1994).

Actualmente existem evidências filogenéticas que suportam a classificação deste microrganismo como um fungo. Fungo atípico, *Pneumocystis* revela propriedades

anômalas relativamente a outros fungos patogênicos para o homem (Stinger 1996, 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Apesar das diversas tentativas para o seu cultivo *in vitro*, as condições necessárias ainda não foram conseguidas, dificultando o estudo do seu desenvolvimento e estádios de diferenciação (Stringer 1996; Thomas & Limper 2004; Aliouat-Denis *et al.* 2009). A sua resistência aos agentes clássicos antifúngicos, pela ausência de ergosterol, sendo o colesterol o esteroide mais abundante na composição da sua parede celular, constitui igualmente uma divergência (Stringer 1996; Stringer *et al.* 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Comparativamente, ainda, a outros fungos, *P. carinii* contém apenas uma a duas cópias do gene 16S-like rRNA, em vez das centenas de cópias como é habitual (Giuntoli *et al.* 1994; Stinger 1996, 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008).

Pneumocystis é um microrganismo eucariota, unicelular, parasita oportunista extracelular obrigatório, que infecta predominantemente os pulmões de hospedeiros mamíferos. É responsável por infecção assintomática ou subclínica nos seus hospedeiros. No homem em situações de imunossupressão, pode provocar uma pneumonia grave geralmente designada pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) ou pneumocistose (Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Beck & Cushion 2009). Estudos bioquímicos e moleculares evidenciaram significativa diversidade genética na população natural de *P. carinii*, tendo sido isolado em diferentes espécies de mamíferos, incluindo o homem, o que ajudou a suportar a hipótese da existência de diferentes espécies deste género (Franklin *et al.* 1999; De Souza & Benchimol 2005). Para além da diversidade genética verificada, *Pneumocystis* isolado do homem não prolifera no pulmão de outro hospedeiro não humano (Stringer *et al.* 2002). Assim, em 2001, foi sugerido e aceite pela comunidade científica que a espécie observada em humanos, denominada na altura *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*, se devia passar a designar *Pneumocystis jirovecii*, em homenagem a Otto Jirovec, um parasitologista Checoslovaco responsável pelas primeiras descrições da infecção por *Pneumocystis* em humanos (Stringer *et al.* 2002; Miller & Huang 2004; De Souza & Benchimol 2005). Hoje, está claro que a PPc não é uma zoonose (Miller & Wakefield 1996; Gigliotti & Wright 2012).

1.2 Taxonomia

A sua correcta posição sistemática encontra-se, ainda nos nossos dias, pouco clara. Classificado inicialmente como protozoário, com base em características morfológicas, na presença de abundante colesterol na parede celular, na sensibilidade a anti-protozoários, como a pentamidina e o trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), na patologia associada e nos mecanismos de variação antigénica (Stringer *et al.* 1993, 2002; Garbe & Stringer 1994; Stringer 1996, 2002; Thomas & Limper 2004), técnicas de biologia molecular têm sido essenciais para melhorar o seu conhecimento.

O desenvolvimento de metodologias baseadas na técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), conduziram este grupo para o Reino *Fungi*, nomeadamente com a determinação, na década de oitenta, da sequência do gene que codifica a subunidade 18S, equivalente à 16S, do ácido ribonucleico ribossómico (rRNA, do inglês *ribosomal ribonucleic acid*) do genoma nuclear de *Pneumocystis*. A análise filogenética do microrganismo, com base na sequência do gene da subunidade 18S do rRNA, evidenciou mais similaridades com alguns fungos, como *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* e *Cryptococcus diffuens*, do que com alguns protozoários, como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei* e *Acanthamoeba castellani* (Edman *et al.* 1988, 1989b; Stringer *et al.* 1989a, 1989b; Cushion 2004; Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Beck & Cushion 2009). Também pela comparação filogenética com outros genes se constatou essa mesma relação evolutiva, como os genes mitocondriais, genes que codificam importantes proteínas e enzimas, particularmente a *dihidrofolato reductase* (DHFR), a β -tubulina (β -TUB), a α -tubulina, a *timidilato sintetase* (TS), a actina, o *arom*, entre outros, colocando *Pneumocystis* próximo dos Ascomycetes (Edman *et al.* 1989a, 1989b; Zhang & Stringer 1993; Stringer 1996; Latouche *et al.* 1997; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Duas outras características moleculares a referir, prendem-se com o facto de este microrganismo apresentar o factor de alongamento III, que se encontra exclusivamente nos fungos (Ypma-Wong *et al.* 1992), assim como de genes relacionados com a resposta ao *stress* (Stringer 2002; Stringer *et al.* 2002).

De um modo geral, o conhecimento do genoma de *Pneumocystis* sugere que este pertença ao Reino *Fungi*, provavelmente num ponto intermédio entre as Classes *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Wakefield *et al.* 1992).

Em 1994 Eriksson propôs uma nova família para este fungo, a *Pneumocystidaceae* e uma nova ordem, a *Pneumocystidales*, inserida na classe *Ascomycota* (Eriksson 1994). Já em 2007 e com base no trabalho de Hibbett *et al.*, a classificação taxonómica esquemática de *Pneumocystis* passou a distribuir-se da seguinte forma:

Super Reino	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Sub-Reino	<i>Dikarya</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Sub-Filo	<i>Taphrinomycotina sensu</i>
Classe	<i>Pneumocystidomycetes</i>
Ordem	<i>Pneumocystidales</i>
Família	<i>Pneumocystidaceae</i>
Género	<i>Pneumocystis</i>
Espécie	<i>P. jirovecii</i> (humanos)

No final da década de oitenta tornou-se evidente que existem espécies de *Pneumocystis* específicos para diferentes hospedeiros, com características genómicas e antigénicas distintas, entre os diversos mamíferos. A principal característica fenotípica, que distingue *Pneumocystis* isolado de diferentes hospedeiros, é a sua especificidade em relação ao hospedeiro (Gigliotti *et al.* 1993; Aliouat *et al.* 1994, 2008; Stringer 1996; Wakefield 1998a; Thomas & Limper 2004; Kaneshino & Limper 2011).

A caracterização ao nível da espécie do género *Pneumocystis*, também necessitou de ser revista após a reclassificação deste parasita no grupo dos fungos (Stringer *et al.* 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Cada espécie passou a ser denominada de acordo com o seu hospedeiro específico (Stringer *et al.* 2002). Assim sendo, foi elaborado um sistema de nomenclatura trinomial, no qual uma terceira designação, aplicada após o epíteto específico, reflectia a origem do agente patogénico (Stringer & Walzer 1996) (**Quadro 1**).

Quadro 1. Nomenclatura trinomial para *Pneumocystis carinii* f. sp. em função do hospedeiro (Adaptado de Vedy *et al.* 2009).

Hospedeiros	Nomenclatura Trinomial
Homem	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>hominis</i>
Rato	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>carinii</i>
Rato	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>rattus</i>
Ratinho	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>muris</i>
Coelho	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>oryctolagi</i>
Porco	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>suis</i>
Cavalo	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>equi</i>
...	...

Já em 1999 um sistema binomial tinha sido proposto, passando o agente patogénico que produzia doença no homem a designar-se de *P. jirovecii*, em honra ao parasitologista Otto Jírovec, um dos primeiros investigadores no estudo da PPc em humanos (Stringer *et al.* 2001, 2002). Actualmente, o género *Pneumocystis*, de acordo com critérios do *Internacional Code of Botanic Nomenclature* (ICNB), compreende cinco espécies: *Pneumocystis murina* em camundongos (*Mus Musculus*), *P. carinii* e *Pneumocystis wakefieldiae* em ratos de espécie *R. norvegicus*, *Pneumocystis oryctolagi* em coelhos e o *P. jirovecii* em humanos, no entanto, foram já identificados *Pneumocystis* em muitos outros mamíferos, mas ainda sem denominação específica. A **Figura 2** representa a diversidade do género *Pneumocystis*. A existência de duas espécies para o mesmo hospedeiro é observada unicamente nos ratos e ambos são específicos desse hospedeiro (Stringer *et al.* 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Assim, apesar do parasita ter especificidade para com o seu hospedeiro, o mesmo hospedeiro, pode ser infectado por vários *Pneumocystis* específicos (Sinclair *et al.* 1991; Miller & Wakefield 1996; Cushion *et al.* 2004).

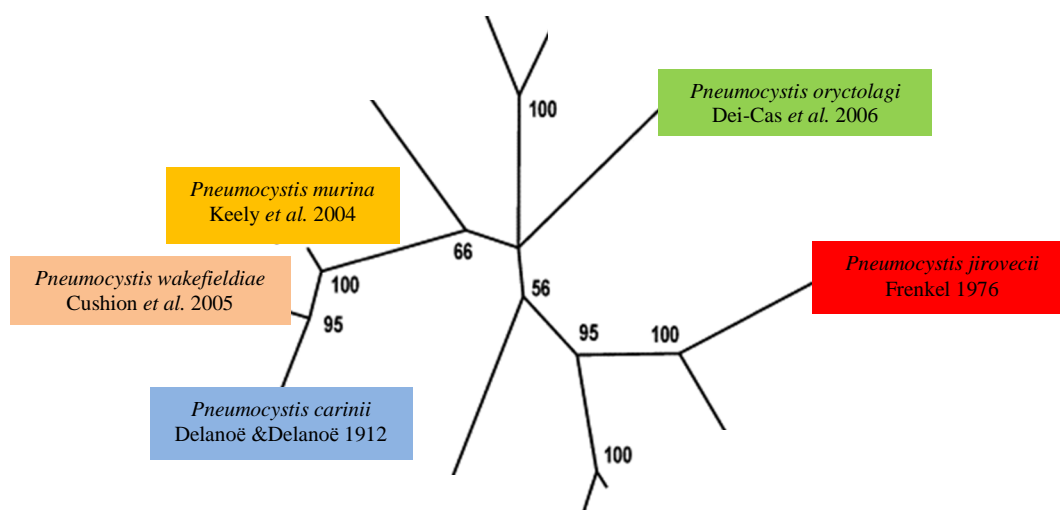


Figura 2 – Árvore filogenética do gênero *Pneumocystis*, demonstrando as cinco espécies a partir da análise de seqüências nucleotídicas dos genes *mtLSU rRNA* e *mtSSU rRNA*. (Adaptado de Aliouat-Denis *et al.* 2008).

Diversos estudos foram desenvolvidos e aprofundados a nível genómico, confirmando a existência de divergências genéticas significativas dentro do gênero *Pneumocystis*. A análise de seqüências do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *desoxiribonucleic acid*) do microorganismo, em mamíferos de diferentes espécies, comprovou variações nucleotídicas em genes distintos, como os genes mitocondriais, que codificam a subunidade grande (*mtLSU rRNA*, do inglês *mitochondrial large-subunit rRNA*), e a subunidade pequena (*mtSSU rRNA*, do inglês *mitochondrial small-subunit rRNA*) do rRNA mitocondrial, a região de espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês *internal transcribed spacer*) do operão de rRNA nuclear, entre outros *loci*, demonstrando a existência de diversos genótipos (Stringer *et al.* 1989a, 1989b; Stringer 1996; Wakefield 1998a, 1998b; Beard *et al.* 2004; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Apesar de quase durante um século ter sido considerado como uma única entidade taxonómica, os dados actuais demonstraram claramente que corresponde a um grupo heterogêneo de populações genética e fenotipicamente isoladas umas das outras, que variam principalmente a nível genómico, antigénico, cariotípico e isoenzimático (Stringer 1996; Hauser *et al.* 1998; Wakefield 1998a, 1998b; Ma *et al.* 2001; Aliouat-Denis *et al.* 2008), e que foram submetidas a processos de adaptação em cada espécie (Calderón *et al.* 2002; Derouiche *et al.* 2009).

1.3 Caracterização do género *Pneumocystis*

1.3.1 Características morfológicas

As características morfológicas de *Pneumocystis* são muito constantes em praticamente todas as espécies de mamíferos (Wazir & Ansari 2004).

Microscopicamente foi, inicialmente, possível identificar duas formas morfológicas de *Pneumocystis*, uma mais pequena, denominada trofozoíto ou forma trófica e outra maior, designada de forma quística (**Figura 3**). Estudos de microscopia electrónica permitiram ainda demonstrar a presença de uma terceira forma, o préquisto ou esporocisto, que compreende três estádios: primário, intermédio e final, directamente envolvidos no seu ciclo de vida (Matsumoto & Yoshida 1984; Haidaris *et al.* 1993; Thomas & Limper 2004).

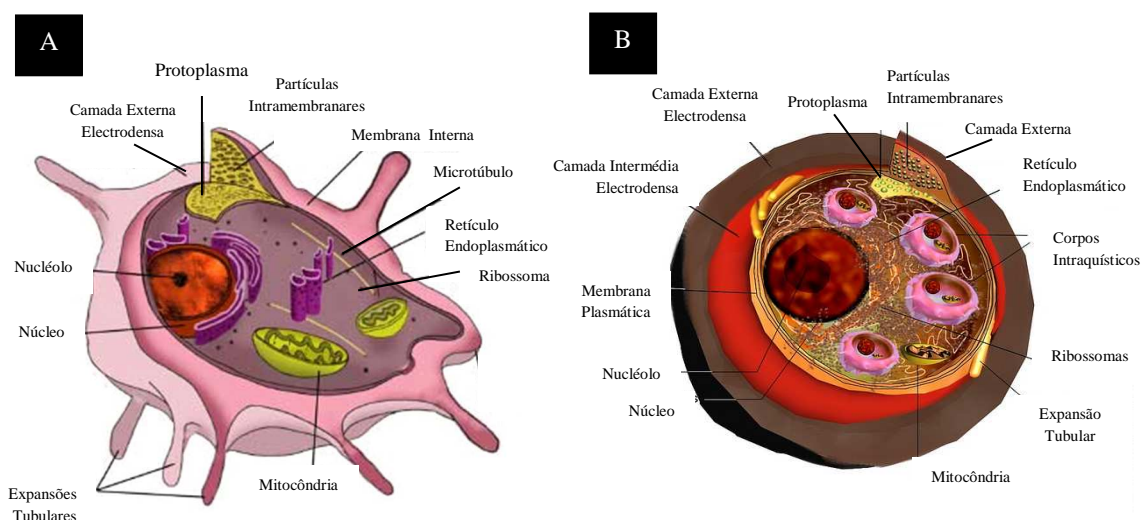


Figura 3 – Representação das principais estruturas celulares das morfologias de *Pneumocystis*: A-trofozoíto e B-quisto (Adaptado de De Souza & Benchimol 2005).

O trofozoíto é a forma mais abundante do ciclo de vida, que representa aproximadamente 90 a 95%, da população parasitária presente nos pulmões dos hospedeiros infectados (Stringer 1996; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2009). Estruturalmente, os trofozoítos são pleomórficos, irregulares, formando agregados complexos, com numerosas interdigitações que por vezes dificultam a distinção entre os trofozoítos (De Souza & Benchimol 2005). Forma vegetativa,

mononucleada com aproximadamente 2-8 μm de diâmetro na sua maioria, constituem células eucarióticas haplóides (Cornillot *et al.* 2002; Dei-Cas *et al.* 2004; Martinez *et al.* 2011), mas a forma diplóide também existe (Wyder *et al.* 1998; Thomas & Limper 2004; Martinez *et al.* 2011). Os trofozoítos apresentam uma parede celular fina e flexível, constituída por uma única camada electrodensa rica em glicoproteínas. O núcleo é pequeno, de localização celular variável, homogéneo, com um nucléolo evidente central ou periférico (Stringer 1996; De Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009). O citoplasma é pobre em organelos (Vavra & Kucena 1970), predominando ribossomas livres, grânulos de glicogénio, mitocôndrias e estruturas ramificadas e tubulares semelhantes ao retículo endoplasmático. Vacúolos, microtúbulos e complexo de Golgi incipiente também já foram reportados, embora raramente observados (Dei-Cas *et al.* 1989). De forma ameboide, evidencia projecções citoplasmáticas que ajudam no processo de adesão aos pneumócitos de tipo I (Aliouat-Denis *et al.* 2008), permitindo deste modo a sua proliferação, através do início do ciclo de vida intrapulmonar e desenvolvimento da infecção (**Figura 3.A**) (Helweg-Larsen 2004; Thomas & Limper 2004).

O esporocisto ou préquisto corresponde ao estágio intermédio de desenvolvimento, entre o trofozoíto e o quisto. Três estádios de préquisto são observados durante esta fase: o préquisto primário, mononucleado, de forma mais oval com aproximadamente 4-5 μm de diâmetro, possui uma parede celular electrodensa, similar à do trofozoíto e um complexo sinaptonémico característico de uma célula que inicia um processo meiótico; o préquisto intermediário apresenta uma parede celular espessa análoga à parede dos quistos; já o préquisto final, de paredes espessas com 4-7 μm , é composto por oito núcleos, que por processos de invaginação da membrana do préquisto, se tornam revestidos por uma membrana, originando os corpos intraquísticos (Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Ao longo desta fase, o préquisto vai-se tornando esférico à medida que amadurece e, no decorrer da maturação, verifica-se ainda um espessamento da parede celular devido à formação de uma camada intermédia. O préquisto resulta de um ciclo de desenvolvimento sexuado, onde o núcleo sofre diversas divisões até originar oito núcleos, característicos do estágio de desenvolvimento seguinte, e é sempre uma célula diplóide, contrariamente ao trofozoíto (Vavra & Kucera 1970; Matsumoto & Yoshida 1986; Ruffolo *et al.* 1989).

O quisto apresenta uma forma esférica com aproximadamente 4-7 μ m de diâmetro (Dei-Cas *et al.* 2004), e uma parede celular espessa e rígida, resultante de um maior desenvolvimento das três camadas existentes no pré-quisto. Análises bioquímicas demonstraram que a parede dos quistos é rica em β -glucano (De Stefano *et al.* 1998). Esta parede contém, igualmente, quitina e outros polímeros complexos, incluindo melanina. No entanto, para promover a estabilidade da parede celular, o glucano é, em muito, responsável pela marcada resposta inflamatória no pulmão dos hospedeiros infectados (Thomas & Limper 2004). O citoplasma do quisto é constituído, na sua maioria, por mitocôndrias e ribossomas, no entanto, retículo endoplasmático e um núcleo com nucléolo são também identificados (De Souza & Benchimol 2005). O quisto maduro encerra oito esporos ou corpos intraquísticos individuais, claramente delineados e protegidos por uma parede celular semelhante à dos trofozoítos; após a sua total maturação estes abandonam o quisto (**Figura 3.B**) (Aliouat-Denis, *et al.* 2009). Os esporos ou corpos intraquísticos representam estruturas haplóides (Martinez *et al.* 2011), que podem assumir diferentes formas, desde esféricos, mais alongados, em forma de banana ou irregulares, ameboides; medem cerca de 1 a 2 μ m e são constituídos por um único núcleo, citoplasma denso, uma mitocôndria bem definida, um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e numerosos ribossomas (Dei-Cas *et al.* 2004).

1.3.2 Ciclo de Vida

Pneumocystis possui um tropismo único para os pulmões, onde permanece como um agente patogénico intra-alveolar sem invadir o hospedeiro, podendo provocar pneumonia apenas quando o sistema imunitário dos seus hospedeiros se encontra debilitado. Raramente ocorre disseminação no organismo, no entanto, em situações de grave imunossupressão ou de outras infeções generalizadas, tal poderá ocorrer (Thomas & Limper 2004, 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008, 2009; Karam & Mosadegh 2014).

Tendo em conta, a inexistência de um sistema experimental no qual este microrganismo possa ser facilmente mantido *in vitro*, o estudo do seu ciclo de vida em detalhe encontra-se dificultado (De Sousa & Benchimol 2005; Jarboui *et al.* 2009).

Nos pulmões de um hospedeiro infectado por *Pneumocystis* podem ser observadas as três formas, já descritas, directamente envolvidas no ciclo de vida, o trofozoíto, o préquisto e o quisto (Thomas & Limper 2004, 2007; Wazir & Ansari 2004; De Sousa & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009).

Estudos realizados vieram demonstrar que ocorre uma evolução de trofozoíto para préquisto e deste para quisto, o qual, após ruptura, liberta oito corpos intraquísticos, evoluindo cada um deles para um novo trofozoíto, dando início a um novo ciclo de desenvolvimento (**Figura 4**) (Vavra & Kucera 1970; Matsumoto & Yoshida 1986; Ruffolo *et al.* 1989).

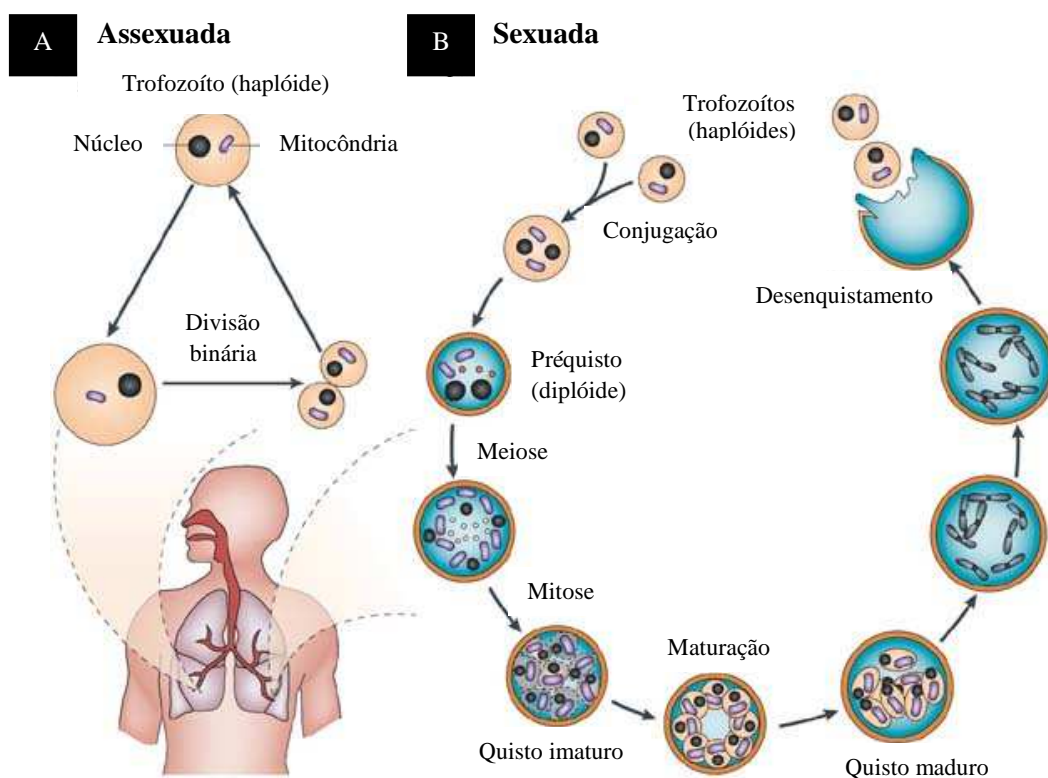


Figura 4 – Representação do ciclo de vida de *Pneumocystis* spp. A - Reprodução assexuada, por divisão binária ou endogenia; B - Reprodução sexuada, por conjugação (Adaptado de Helweg-Larsen *et al.* 2004).

Diversos autores consideraram diferentes hipóteses para o ciclo de vida de *Pneumocystis* mas todos concordam na existência de dois ciclos de reprodução, o ciclo de reprodução assexuada e o ciclo de reprodução sexuada. A reprodução assexuada do

ciclo de vida de *Pneumocystis* ocorre por divisão binária ou por endogenia dos trofozoítos haplóides ou diplóides, consistindo na formação de duas ou mais células (Helweg-Larsen 2004; De Sousa & Benchimol 2005; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2009; Beck & Cushion 2009). Pode ocorrer também a fusão de dois trofozoítos haplóides que, por conjugação, originam uma célula diplóide por reprodução sexuada. Esta célula inicia um processo de divisão meiótica, com duas fases (meiose I e II), seguida de mitose (Stringer 1996; Helweg-Larsen 2004; De Sousa & Benchimol 2005; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008, 2009).

Nesta fase, três estádios de préquisto podem ser observados, primário, intermédio e final, cada um com dois, quatro e oito núcleos haplóides, respectivamente (Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008). No final, cada um destes núcleos é envolvido por uma membrana plasmática própria, proveniente da invaginação da porção interna da membrana celular do préquisto maduro, dando origem aos corpos intraquísticos (Matsumoto & Yoshida 1986; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Quando se completa a formação dos oito corpos intraquísticos obtém-se o quisto maduro, o qual está pronto a romper, iniciando um novo ciclo. Cada corpo intraquístico origina um novo trofozoíto (De Sousa & Benchimol 2005; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2009).

O género *Pneumocystis* parece constituir uma excepção no Reino dos fungos, já que a maioria não consegue completar o ciclo sexuada em animais (Sexton & Howlett 2006).

1.4 Epidemiologia da infecção por *Pneumocystis jirovecii*

1.4.1 Frequência e distribuição geográfica

Pneumocystis é um microrganismo ubíquo que infecta os pulmões de mamíferos terrestres em praticamente todas as regiões geográficas, com a possível exceção do Ártico e da Antártida, onde a sua presença ainda não foi observada. Estudos sobre a presença deste parasita em mamíferos marinhos ainda não foram reportados (Morris *et al.* 2004b; Cushion 2010).

A PPc foi inicialmente descrita como causa de pneumonia intersticial que afectava preferencialmente crianças prematuras ou malnutridas, em orfanatos na Polónia (Hughes 2001; Catherinot *et al.* 2010), constituindo aproximadamente 68% dos casos conhecidos (Catherinot *et al.* 2010); até 1980 a frequência era baixa e estava associada a indivíduos imunocomprometidos devido a terapia imunossupressora, a doenças neoplásicas e imunodeficiências congénitas (Calderón *et al.* 2002; Morris *et al.* 2004b). Nessa altura, verificavam-se taxas de PPc entre 5 e 25% nos doentes submetidos a transplante de órgãos, entre 2 e 6% nos doentes com doenças vasculares colagénicas, e entre 1 e 25% nos doentes com neoplasias (Morris *et al.* 2004b). Após a introdução da quimioprofilaxia anti-*P. jirovecii*, como o TMP-SMX e a pentamidina, a incidência da doença diminuiu.

Com o advento do vírus da imunodeficiência humana (VIH) no início da década de oitenta do século XX, o número de indivíduos com infecção por *P. jirovecii* aumentou substancialmente (Miller *et al.* 2013; Esteves *et al.* 2014a), tornando a PPc na primeira doença definidora de sida, com elevada prevalência, de 20 casos em 100 pessoas/ano, em doentes com contagem de linfócitos T CD4⁺ inferior a 200 células/mm³ (Phair *et al.* 1990; Kovacs *et al.* 2001; Huang *et al.* 2006). Aproximadamente 75% de doentes com infecção por VIH desenvolvia, pelo menos, um episódio de PPc no decorrer da sua vida (Hay *et al.* 1988; Huang *et al.* 2006; Varela *et al.* 2011). Com a introdução em 1989 da profilaxia anti-*P. jirovecii*, verificou-se um importante declínio na incidência desta doença (Fischl *et al.* 1988) e, a partir do ano de 1996, a terapêutica antirretrovírica de combinação (TARVc) seria, também, responsável pela expressiva redução do número de casos de PPc para valores de 3,4% por ano até 1995, e posteriormente de 21,5% por ano, entre 1996 e 1998; assim como de outras doenças oportunistas (Kaplan *et al.* 2000; Stinger *et al.* 2002; Helweng-Larsen 2004; Morris *et al.* 2004b; Rodriguez & Fishman

2004; Calderón 2009; Esteves *et al.* 2014b). Apesar da diminuição dos casos de PPc entre os adultos na era da TARVc, a infecção continua a constituir uma doença oportunista comum e importante em indivíduos com infecção por VIH, e a sua maior causa de morbilidade e mortalidade, nomeadamente nos Estados Unidos da América (EUA) (Kaplan *et al.* 2000; Morris *et al.* 2004b). Walzer *et al.* em 2008, num estudo realizado nos EUA, relata a forma como as características demográficas dos doentes com PPc sofreram alterações ao longo do tempo, reflectindo as modificações na epidemia da infecção por VIH. Antes de 1996, indivíduos com PPc eram predominantemente homossexuais e utilizadores de drogas intravenosas. Após 1996, verificou-se um aumento do número de indivíduos de ambos os sexos, heterossexuais com PPc. De facto, mais de metade dos casos de PPc era diagnosticada em indivíduos que desconheciam a sua condição de infecção por VIH (Morris 2008; Walzer *et al.* 2008). Já na maioria dos indivíduos imunocomprometidos seronegativos para VIH, o risco de PPc era de aproximadamente 5 a 15% (Fishman 1998a, 1998b). Os principais factores de risco da PPc, constituíam deficiências na imunidade celular e doentes submetidos a determinadas terapêuticas com acção imunossupressora (Fishman 2001; Rodrigues & Fishman 2004; Worth *et al.* 2005; Craker 2010; Struijk *et al.* 2011; Yoon *et al.* 2012; Neumann *et al.* 2013; Shinohara *et al.* 2013).

Relativamente à União Europeia, o *European Center for Disease Control and Prevention* (ECDC) tem reportado resultados sobreponíveis aos verificados nos EUA, fazendo transparecer o sucesso das profilaxias, e das terapêuticas introduzidas e disponibilizadas à população infectada por VIH/sida (Weverling *et al.* 1999; ECDC 2012). No entanto, nos últimos anos o espectro de indivíduos que desenvolvem PPc tem vindo a alterar-se, enquadrando-se nos nossos dias em: doentes não diagnosticados ou incompatíveis com o tratamento prescrito para a PPc (Morris *et al.* 2002); doentes que desconhecem a sua condição de VIH/sida, ou que não possuem uma resposta eficaz à TARVc (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Matos & Esteves 2010a); doentes sem acesso a profilaxia anti-PPc, ou sem acesso aos medicamentos antirretrovíricos (Morris *et al.* 2004; Matos & Esteves 2010a); doentes imunossuprimidos, nomeadamente transplantados, doentes sujeitos a quimioterapia para tratamento de neoplasia, doenças autoimunes e mais recentemente com imunodeficiências primárias, principalmente em países desenvolvidos (Morris *et al.* 2002, 2004b; Stringer *et al.* 2002; Matos *et al.* 2006;

Calderón *et al.* 2010; Catherinot *et al.* 2010; Matos & Esteves 2010a). Em doentes oncológicos, antes da implementação da quimioprofilaxia, a taxa da PPc apresenta-se entre 22 e 45%, de acordo com o tipo de neoplasia. Já os transplantados de pulmão representam mais de 25%, comparativamente a outros tipos de transplantados, sendo a média de aproximadamente 5 a 10% (Sepkowitz 2002; Chuang *et al.* 2007; Reid *et al.* 2011). Entre os doentes com doenças autoimunes, nomeadamente reumatológicas, PPc é descrita em 0,4% dos indivíduos com artrite reumatoide que são submetidos ao tratamento com infliximab, o qual inibe o TNF- α (Kaur & Mahl 2007).

O aparecimento de resistências, quer ao nível de VIH, quer ao nível de *Pneumocystis*, pode, também, contribuir para o aumento da incidência da doença (Morris 2008; Matos & Esteves 2010a). Em Portugal, num estudo interessante realizado por Matos *et al.*, em indivíduos imunocompetentes com patologia pulmonar, ficou demonstrada infecção por *P. jirovecii* em 24,4% dos casos (Matos *et al.* 2006). Tais dados, são corroborados por outros estudos (Nevez *et al.* 1997; Medrano *et al.* 2005).

Nos países não industrializados ou em vias de desenvolvimento, a PPc ocorre com elevada incidência, uma vez que a falta de profilaxia adequada e de terapêuticas antirretrovíricas aumenta substancialmente o risco de infecção (Fisk *et al.* 2003). Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimava que, no final de 2013, de um total de 35 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo por VIH, 90% habitavam em países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, com especial incidência no sudoeste asiático e na África subsariana (OMS 2012). Em alguns estudos realizados na Tailândia, a PPc foi diagnosticada entre 19 e 40% dos doentes com infecção por VIH (Anekthananon *et al.* 2004; Des Armas *et al.* 2011; Miller *et al.* 2013). Já na América do Sul a sida representa um importante problema de saúde pública, nomeadamente no Brasil, onde a PPc representa 55% dos casos entre doentes seropositivos para VIH (Weinberg & Duarte 1993; Des Armas *et al.* 2011). As crianças constituíram, desde sempre, um grupo etário onde se registou uma prevalência significativa de *P. jirovecii*. Vargas *et al.* realizaram estudos necrópsicos de pulmões de crianças que faleceram de síndrome de morte súbita, tendo observado que uma percentagem relevante destas, 35% no Chile e 14% em Oxford, era portadora de *P. jirovecii*, contrariamente às que faleceram por outras causas, cuja percentagem era de aproximadamente 2,9% (Vargas *et al.* 1999). Contudo, ficou, por esclarecer de modo aprofundado esta relação.

Curiosamente, contrariamente ao que se verifica em muitas outras regiões em vias de desenvolvimento, a PPc na população adulta dos países do continente Africano é, aparentemente, muito menor. Estudos realizados relatam uma prevalência entre 5 e 11% nos doentes com infecção por VIH (Abouya *et al.* 1992). No entanto, a exposição a *P. jirovecii* é comum, como demonstrado em crianças africanas que apresentam elevada frequência de anticorpos anti-*P. jirovecii* (Wakefield *et al.* 1990b). Alguns factores têm sido avançados por forma a justificar tais taxas entre os adultos, nomeadamente que tenha sido subdiagnosticada devido aos recursos limitados, como profissionais pouco experientes e equipamento inadequado, bem como ao facto dos doentes seropositivos para VIH, não viverem tempo suficiente para desenvolverem infecções oportunistas, como a PPc (Wakefield *et al.* 1990b; Barry & Johnson 2001; Matos 2012; Lowe *et al.* 2013). Nos últimos anos começaram a surgir registos que apontam no sentido do aumento da PPc em África, à medida que a epidemia de VIH/sida cresce (Fisk *et al.* 2003). Está ainda, porém, por esclarecer se se deve efectivamente ao aumento da incidência da doença, ou se é resultado de uma melhoria das técnicas de detecção da mesma (Matos 2012). Na África subsariana, a tuberculose é uma doença muito comum, sendo frequente a co-infecção com PPc nestes doentes (Orlovic *et al.* 2001; Murray 2005; Nowaseb *et al.* 2014).

1.4.2 Transmissão

Os mecanismos de transmissão de *Pneumocystis* têm importantes implicações clínicas e de saúde pública (Chabé *et al.* 2012; Morris & Norris 2012). Este é um fungo ubíquo, que infecta tanto o homem como outros mamíferos. Apesar da panóplia de estudos já desenvolvidos, não se conhece ainda com rigor qual o seu reservatório natural, nem exactamente o modo como é transmitido (Vavricka *et al.* 2004; Morris *et al.* 2008b).

Historicamente, era assumido que a infecção por *Pneumocystis* era adquirida durante a infância, e que a PPc ocorria da reactivação de uma infecção latente, quando o sistema imunitário se encontrava debilitado. Recentemente foi reconhecido que a infecção *de novo*, através do ambiente ou do contacto com indivíduos com PPc ou colonizados por *Pneumocystis* podia resultar em transmissão (Wakefield 1994, 1996; Kaneshiro & Maiorano 1996; Vargas *et al.* 2001; Morris & Norris 2012).

1.4.2.1 Modo de infecção

A forma como o homem adquire a infecção e o número de microrganismos necessários para a desencadear não está ainda bem esclarecida; diversos estudos tem sido realizados, que corroboram algumas teorias (Powles *et al.* 1992; Morris *et al.* 2002).

Walzer e Hughes, no final da década de setenta e início dos anos oitenta do século passado, desenvolveram alguns estudos em cobaias que sugerem que a infecção se transmite por via aérea, através do aparelho respiratório, por inalação; no entanto, a forma infectante ainda não está bem definida (Walzer *et al.* 1977; Hughes 1982). Apesar de ter sido detectado DNA de *Pneumocystis* no ar, não foi possível ainda isolar o parasita na sua forma ambiental, que poderá ser diferente das geralmente encontradas nos pulmões. *P. jirovecii* poderá então sobreviver de uma forma latente, por meio de esporos, por um mecanismo independente dos seus hospedeiros (Wakefield 1996; Helweg-Larsen 2004; Thomas & Limper 2007). A espessa parede celular do quisto maduro parece constituir um factor primordial para a manutenção da infecciosidade do agente durante a transmissão aérea. A detecção de quistos maduros no lúmen dos brônquios sugere a eventualidade dos quistos atingirem o exterior e serem transmitidos para um novo hospedeiro (Dei-Cas 2000).

Uma das primeiras teorias a ser considerada foi a da reactivação de uma infecção latente, que postulava que o primeiro contacto com *Pneumocystis* ocorria logo nos primeiros meses de vida e em que o sistema imunitário controlaria eficazmente essa infecção primária assintomática, mas o microrganismo teria a capacidade de permanecer latente no pulmão do seu hospedeiro, até ter a possibilidade de proliferar e causar doença, com uma quebra do sistema imunitário (Morris *et al.* 2002; Wakefield 2002; Miller & Huang 2004). Esta teoria tem como base estudos serológicos, em que a maioria das crianças consideradas saudáveis apresenta anticorpos anti-*Pneumocystis*, e que a prevalência desses anticorpos específicos parece aumentar com a idade (Vargas *et al.* 2001; Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002; Helweg-Larsen 2004; Miller & Huang 2004). Diversas linhas orientadoras, incluindo as características de *Pneumocystis*, a elevada seroprevalência de anticorpos anti-*Pneumocystis* na população, a alta taxa da PPc em crianças imunocomprometidas e a detecção de *Pneumocystis* em hospedeiros normais, suportam a ideia de que a reactivação contribui para o desenvolvimento da PPc (Morris & Norris 2012). *Pneumocystis* apresenta várias

características que sugerem a sua longa permanência no hospedeiro. Desde logo, a existência de um mecanismo de variação antigénica, tendo por base o conjunto de glicoproteínas *major* de superfície, denominadas MSG (do inglês, *major surface glycoprotein*), que são codificadas por uma família génica, com cerca de 100 genes. A regulação da expressão deste conjunto de genes permite que *P. jirovecii* possa apresentar isoformas da MSG diferentes, e desta forma, evadir-se da resposta imunitária do hospedeiro (Nakamura 1998) por um longo período de tempo, o que permite a ocorrência de colonização (Gigliotti 1992; Morris & Norris 2012). A especificidade de *Pneumocystis* para um hospedeiro mamífero em particular, também alude a que o microrganismo tenha co-evoluído conjuntamente com o seu hospedeiro (Gigliotti *et al.* 1992). Adicionalmente, a dificuldade de manter *Pneumocystis* em cultura *in vitro* sugere a sua evolução por forma a requerer um ambiente extremamente específico, não sendo, pois, fácil de reproduzir fora do hospedeiro (Morris & Norris 2012).

Nos últimos anos diversos estudos têm demonstrado a presença de *P. jirovecii* em amostras biológicas respiratórias de indivíduos imunocompetentes, sem evidência clínica de PPc (Sing *et al.* 1999, 2001; Vargas *et al.* 1999), fazendo transparecer que o agente consegue sobreviver no seu hospedeiro por tempo indeterminado, de forma controlada, sem causar sintomatologia (Morris *et al.* 2002; Wakefield 2002). Não obstante, muitos outros estudos não consolidam tais achados, pelo menos, como único mecanismo para estabelecimento da infecção (Stringer *et al.* 2002; Matos & Esteves 2010b), demonstrando que o microrganismo poderá ser eliminado pelo hospedeiro antes de causar infecção (Wakefield *et al.* 1990c; Vargas *et al.* 1995; Stringer *et al.* 2002; Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005) e sugerindo que a exposição aos humanos poderá ser também caracterizada por uma colonização transitória ou intermitente (Morris *et al.* 2002).

Embora a reactivação de uma infecção latente possa constituir um mecanismo para a PPc, estudos em humanos e cobaias demonstraram que a infecção *de novo* também ocorre (Stringer *et al.* 2002). Assim, relativamente à teoria da reinfecção, mais actual e mais bem fundamentada, sugere a existência de uma exposição quase permanente, ao longo da vida, entre indivíduos e possíveis fontes de infecção, supondo que as reinfecções poderão ocorrer através de reservatórios ambientais ou directamente entre humanos (Morris *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004). Nas últimas décadas, o uso de

técnicas de biologia molecular, nomeadamente a genotipagem, tem contribuído para a obtenção de mais e novos dados sobre a transmissão desta infecção. Alguns estudos realizados em doentes seropositivos para VIH e com episódios recorrentes de PPc, permitiram verificar a presença de diferentes genótipos de *P. jirovecii*, no mesmo indivíduo (Keely & Stringer 1996, 1997; Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002; Matos *et al.* 2003a; Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005; Matos & Esteves 2010b). Estes dados sugerem que a infecção tenha sido adquirida *de novo*, e que cada genótipo encontrado de *P. jirovecii* represente uma nova infecção, contrariamente à teoria da reactivação de uma infecção adquirida anteriormente (Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002). Também a distribuição geográfica contraria a teoria da reactivação, quanto à frequência de PPc e dos genótipos de *P. jirovecii*. Estudos epidemiológicos realizados verificaram a existência de uma grande variabilidade de frequências genótípicas em isolados de *Pneumocystis*, de acordo com a distribuição geográfica da doença. Esta variação parece estar relacionada com o local de residência dos doentes e não com o local de nascimento do indivíduo, fazendo transparecer que a infecção foi adquirida recentemente (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002; Miller & Huang 2004; Matos & Esteves 2010b; Morris & Norris 2012). Esta infecção pode ter resultado de contacto com um reservatório ambiental ou de um hospedeiro infectado, mas pouco provável como resultado de uma reactivação (Beard *et al.* 2000; Miller *et al.* 2005; Morris & Norris 2012).

Alguns estudos demonstraram também uma significativa associação entre doentes sujeitos a profilaxia por sulfa, como o TMP-SMX e a presença de mutações no gene que codifica a enzima dihidropteroato sintetase (DHPS, do inglês *dihydropteroate synthase*) de *Pneumocystis* (Kazanjian *et al.* 2000; Huang *et al.* 2000; Costa *et al.* 2003, 2005; Matos & Esteves 2010a), cujas mutações também estão correlacionadas com a localização geográfica (Huang *et al.* 2000, 2001; Miller & Huang 2004; Hauser *et al.* 2010). Tais alterações foram observadas em doentes com PPc sem prévia exposição a esse tipo de terapêutica, sugerindo que transmissão recente tenha ocorrido directamente de doentes com história de contacto com sulfa ou através de uma fonte ambiental (Huang *et al.* 2000; Miller & Huang 2004; Hauser *et al.* 2010).

Este agente patogénico, para além do homem, já foi detectado no pulmão de outros mamíferos, como primatas não humanos, roedores, canídeos, entre outros, o que

demonstra a sua capacidade patogénica e distribuição ubíqua (Laakkonen 1998; Nielsen *et al.* 1998; Laakkonen *et al.* 2001). DNA de *Pneumocystis* isolado do homem foi também já identificado em amostras de ar (Wakefield 1994, 1996, 2002; Maher *et al.* 2001; Choukri *et al.* 2010) e de água (Casanova-Cardiel & Leibowitz 1997). Um estudo sugere que o solo possa constituir também uma fonte de infecção, nomeadamente em actividades como a jardinagem e o campismo (Navin *et al.* 2000; Helweg-Larsen 2004). Contudo, até ao momento, ainda não foram identificados reservatórios ambientais de *Pneumocystis*. A transmissão por via aérea tem sido demonstrada em estudos com modelos animais imunocompetentes e imunocomprometidos, suportando fortemente a hipótese de que a transmissão pode também ocorrer entre indivíduos (Morris & Norris 2012). No entanto, a transmissão entre humanos por via aérea ainda não foi confirmada (Hughes 2001; Matos & Esteves 2010b). A possibilidade de transmissão da PPc, entre humanos surgiu depois de relatos de um aumento do número de casos de PPc em unidades oncológicas e de transplantação (Singer *et al.* 1975; Chave *et al.* 1991; Cheung *et al.* 1994; Schmoldt *et al.* 2008). Estudos recentes, realizados em ambiente hospitalar, a amostras recolhidas em filtros de ar em locais com doentes infectados, suportam igualmente este tipo de transmissão em humanos, em que a detecção e identificação de genótipos de *P. jirovecii* em alguns desses estudos eram sobreponíveis aos observados nas amostras biológicas dos doentes, reforçando a perspectiva de que, a eventual aquisição poderá estar relacionada com a presença de DNA de *Pneumocystis* no ar (Olsson *et al.* 1998).

A transmissão nosocomial parece constituir igualmente uma fonte de aquisição da infecção (Nevez *et al.* 2008). Estudos serológicos efectuados a profissionais de saúde constatarem um aumento de anticorpos anti-*P. jirovecii* nos que mantinham contacto directo com doentes com co-infecção VIH/*P. jirovecii* (Leigh *et al.* 1993b; Lundgren *et al.* 1997; Vargas *et al.* 2000), podendo assim funcionar como potenciais hospedeiros intermediários na transmissão de *Pneumocystis* a indivíduos susceptíveis em ambiente hospitalar (Wissmann *et al.* 2010). Alguns estudos demonstraram ainda que, profissionais de saúde e membros da sua família podem tornar-se colonizados após contacto com doentes com PPc; no entanto, nem todos os estudos confirmam tais resultados (Lundgren *et al.* 1997).

As grávidas parecem constituir igualmente, de acordo com algumas evidências, um reservatório da infecção, representando um papel crucial na transmissão aos seus recém-nascidos (Miller *et al.* 2002; Vargas *et al.* 2003). A identificação de genótipos sobreponíveis entre a criança e a mãe são dados que sustentam esta hipótese (Miller *et al.* 2002). Alguns estudos propõem uma provável transmissão vertical, sugerindo que o estado imunitário da mulher durante a gravidez pode favorecer a transmissão de *Pneumocystis* ao feto através da placenta, a qual seria permeável ao mesmo (Cere *et al.* 1997; Montes-Cano *et al.* 2009). Tal hipótese tem sido encarada com muitas reservas, uma vez que existem estudos com resultados não coincidentes (Icenhour *et al.* 2002).

1.4.2.2 Colonização por *P. jirovecii*

A colonização por *Pneumocystis* ou estado de portador assintomático ou subclínico, contrariamente à doença por *Pneumocystis*, ocorre em indivíduos com diferentes tipos de imunodeficiência, ou mesmo saudáveis, sem sinais ou sintomas de doença (Maskell *et al.* 2003; Wakefield *et al.* 2003; Morris *et al.* 2004a, 2004b, 2004c, 2008; Matos *et al.* 2006; Calderón 2010; Calderón & Dei-Cas 2010; Cushion 2010). Embora o estado de colonizado possa ocasionalmente ser detectado em amostras respiratórias de indivíduos assintomáticos, através de técnicas de coloração citoquímicas de rotina ou fluorescentes, devido às baixas cargas parasitárias, técnicas de PCR são geralmente necessárias para determinar a presença de DNA do microrganismo (Nevez *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2002).

Os principais factores de risco associados à colonização em humanos encontram-se resumidos no **Quadro 2**.

Quadro 2 - Factores de risco de colonização por *Pneumocystis* (Adaptado de Morris & Norris 2012).

Factores de risco

Condições clínicas

- Crianças, sobretudo com infecções do aparelho respiratório superior
- Gravidez
- Infecção VIH
- Transplantados de órgãos
- Doenças autoimunes
- Doenças crónicas pulmonares, especialmente Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC)
- Neoplasias

Terapêuticas

- Corticosteroides
- Inibidores do factor de necrose tumoral α (TNF- α)
- Outros imunossupressores

Factores de risco clínicos

- Diminuição de células T CD4⁺
- Fumadores
- Localização geográfica
- História recente de exposição a PPc
- Falta de profilaxia para PPc.

As crianças parecem apresentar uma maior frequência de colonização relativamente aos adultos, uma vez que, o primeiro contacto com *Pneumocystis* parece ocorrer cedo, tendo em conta o aumento de anticorpos anti-*P. jirovecii* observado nos primeiros anos de vida (Wakefield *et al.* 1990c; Vargas *et al.* 2001; Samuel *et al.* 2011). Vargas *et al.* no Chile, detectaram DNA de *P. jirovecii* em amostras de aspirados nasofaríngeos em 32% das crianças saudáveis estudadas (Vargas *et al.* 2001). Já num outro estudo, efectuado em amostras obtidas *post-mortem*, recolhidas entre 1998 e 2000, o DNA de *P. jirovecii* foi identificado em 51,7% das crianças (Vargas *et al.* 2005). No entanto, neste grupo, à semelhança do que se verifica nos adultos, ainda não é exactamente conhecido o papel da colonização por *Pneumocystis* no desenvolvimento da PPc, bem como na sua circulação.

A alteração da imunidade relacionada com a gestação pode também aumentar o risco de colonização por *Pneumocystis*. Entre 33 gestantes assintomáticas seguidas no terceiro trimestre de gestação, 16% encontravam-se colonizadas, enquanto o microrganismo não foi detectado em nenhuma das 28 mulheres de controlo que não se encontravam grávidas (Wissmann *et al.* 2010).

Segundo alguns estudos, a idade avançada parece constituir também um factor predisponente à colonização por *P. jirovecii* (Helweg-Larsen *et al.* 2002), inclusivamente sem doença de base. Colonização foi identificada num estudo com adultos séniores, em que a prevalência verificada foi de 21,5% em amostras de aspirados nasofaríngeos, no entanto, o significado clínico deste achado mantém-se ainda por determinar (Vargas *et al.* 2010). Adicionalmente, os adultos séniores frequentemente apresentam condições clínicas que, quando tratadas com imunossuppressores aumentam o risco de desenvolvimento da PPc. A diminuição da imunidade celular que acompanha o processo de envelhecimento pode facilitar também, a colonização pelo microrganismo (Mori *et al.* 2008).

Os casos de colonização por *Pneumocystis* têm sido descritos, fundamentalmente, em doentes com infecção por VIH. A taxa de prevalência de portadores assintomáticos encontra-se entre os 10 e 69% (Leigh *et al.* 1993a; Nevez *et al.* 1999; Matos *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2002; Huang *et al.* 2003; Wakefield *et al.* 2003). Esta variabilidade resulta das diferentes populações de doentes estudadas, tipo de amostras recolhidas e dos diferentes métodos de detecção utilizados (Morris & Norris 2012). A relação entre colonização e a contagem de células T CD4⁺ em doentes VIH, encontra-se ainda em debate; é no entanto claro que, a colonização ocorre tanto em indivíduos com contagem de células T CD4⁺ elevadas, bem como nos doentes sob TARVc ou profilaxia anti-*P. jirovecii* (Huang *et al.* 2003). Constituem ainda factores de risco de colonização nos doentes VIH, o tabagismo e a localização geográfica (Morris *et al.* 2004a).

Nos indivíduos imunocomprometidos seronegativos para VIH, a frequência de portadores de *P. jirovecii* varia entre os 4,4 e 40% (Nevez *et al.* 1997, 1999; Ribes *et al.* 1997; Weig *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 2002; Matos *et al.* 2003a). Doentes com determinadas patologias sob terapêutica imunossupressora, constituem um grupo de risco de colonização, conferindo a doença de base, muitas vezes, susceptibilidade (Le Gal *et al.* 2012; Morris & Norris 2012). Um estudo recente demonstrou que 18% dos

doentes transplantados sintomáticos se encontravam colonizados, apesar da administração de profilaxia (Hauser *et al.* 2011). Já um outro trabalho, envolvendo doentes com doenças autoimunes distintas, e utilizando amostras de expectoração induzida (EI), verificou que 16% destes se encontravam colonizados por *Pneumocystis* (Mekinian *et al.* 2011).

Em diversas doenças pulmonares crónicas a colonização por este microrganismo tem sido igualmente observada. A prevalência da colonização evolui de acordo com a população e a patologia de base (Gutiérrez *et al.* 2011). Na fibrose quística as taxas encontram-se entre 1% e 22% (Sing *et al.* 2001; Gal *et al.* 2010). Doentes com patologia intersticial pulmonar parecem ter elevada prevalência de colonização, particularmente quando sob corticosteroides. Segundo um estudo de Vidal *et al.* em doentes com suspeita de doença intersticial pulmonar, 34% encontravam-se colonizados (Vidal *et al.* 2006). Os doentes com DPOC e bronquite crónica representam de igual modo, um grupo com relevante prevalência de colonização por *Pneumocystis*. Sivam *et al.* detectaram colonização em 42,1% dos indivíduos com DPOC avançada (Sivam *et al.* 2011). Já Maskell *et al.* nas suas pesquisas detectaram o agente patogénico em 37% dos doentes com DPOC severa e em 5% com doença ligeira (Maskell *et al.* 2003), independentemente da história de tabagismo ou terapêutica por corticosteroides, constituindo assim um factor de risco acrescido (Morris *et al.* 2004c, 2008b; Huang 2011; Norris & Morris 2011).

De La Horra *et al.* demonstraram que doentes com neoplasia do pulmão de pequena célula apresentam 100% de colonização (De La Horra *et al.* 2004), comparativamente a 29% em outras neoplasias primitivas do pulmão de não-pequena célula (Zahar *et al.* 2002; Mori *et al.* 2010); porém, uma relação clara está ainda por esclarecer.

Colonização por *P. jirovecii* foi também já reconhecida em doentes com diversas outras doenças crónicas, nomeadamente a diabetes mellitus, sarcoidose e mieloma múltiplo (Sinicco *et al.* 1996; Nevez *et al.* 1999, 2001; Sanno *et al.* 2007).

A utilização de corticosteroides está igualmente associada à colonização por este agente patogénico. Um estudo realizado em indivíduos submetidos a broncoscopia revelou que, 44% dos doentes sob terapia por corticosteroides se encontravam colonizados por *P. jirovecii* e em 12% dos que não estavam sujeitos a este tipo de terapêutica (Maskell *et al.* 2003). Helweg-Larsen *et al.* confirmaram esta associação, num estudo em doentes

com pneumonia bacteriana (Helweg-Larsen *et al.* 2002), e muitos outros estudos em doentes com patologia neoplásica (Barbounis *et al.* 2005; Bollée *et al.* 2007).

Com o recente aumento da utilização de inibidores, como o factor de necrose tumoral α (TNF- α), tem sido reconhecido um aumento do risco de colonização nesses doentes (Saito *et al.* 2004). Wissmann *et al.*, num estudo realizado a 78 doentes com doença reumatoide verificaram que, 25% se encontravam colonizados por *P. jirovecii* (Wissmann *et al.* 2008, 2011; Mori & Sugimoto 2012). A utilização de infliximab por um período superior a três anos e a utilização de corticosteroides constituem factores de risco de colonização (Stratakos *et al.* 2005; Worth *et al.* 2005; Wissmann *et al.* 2011).

A diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ parece conferir um aumento do risco. Aproximadamente 30% dos doentes com contagem de células T CD4⁺ abaixo de 400 cells/ μ l, ou o rácio linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ abaixo de 1, encontram-se colonizados (Morris & Norris 2012).

Estudos recentes demonstraram colonização em aproximadamente 20% de indivíduos saudáveis (Nevez *et al.* 1997; Medrano *et al.* 2005), contrariamente a outros grupos de estudo (Leigh *et al.* 1993b; Matos *et al.* 2001; Vargas *et al.* 2003). Ponce *et al.* em Santiago no Chile analisaram amostras de pulmão obtidas *post-mortem* da população em geral, e verificaram que 65% dos indivíduos se encontravam colonizados por *P. jirovecii* (Ponce *et al.* 2010); estes dados são difíceis de comparar a outros estudos, tendo em conta a dificuldade de obtenção de tal amostragem. Estes achados sugerem, todavia, que indivíduos colonizados com baixas cargas parasitárias podem ser mais comuns do que o previsto, e que este grupo de portadores temporários pode também possuir um papel crucial e activo na circulação do microrganismo, já que vão sendo reinfectados ao longo da sua vida (Medrano *et al.* 2005; Ponce *et al.* 2010; Morris & Norris 2012).

A colonização por *Pneumocystis* representa assim um papel importante no mecanismo de desenvolvimento e transmissão da doença a indivíduos susceptíveis, sugerindo uma particular importância no eventual tratamento ou prevenção. Nos últimos anos, tem por isso adquirido especial interesse e foco.

1.5 Enquadramento clínico do *P. jirovecii* nos humanos

1.5.1 Apresentação e importância clínica

Pneumocystis jirovecii é, como já referido, um fungo capaz de provocar pneumonia grave no homem, cuja duração e gravidade depende de diversos factores, sobretudo, do estado imunitário do hospedeiro e do número de agentes patogénicos presentes no pulmão. Assim sendo, não existem manifestações clínicas patognomónicas da PPc, uma vez que a evolução natural da infecção é muito variada (Hughes 1994; Huang *et al.* 2006; Fujii *et al.* 2007; Varela *et al.* 2011).

O quadro clínico da PPc caracteriza-se por diversos sintomas, em particular, febre, dispneia progressiva e tosse, regra geral não produtiva ou produzindo pequenas quantidades de expectoração esbranquiçada (Kovacs *et al.* 2001; Walzer 2002; Thomas & Limper 2004; Huang *et al.* 2006; Calderón *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011; Guo *et al.* 2014). Outros sintomas podem desenvolver-se como tosse produtiva, dor no peito, ou até ligeiros sintomas gripais (Munksgaard 2004; Calderón *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011). O exame físico geralmente revela taquipneia, taquicardia, ou cianose (Walzer 1999; Thomas & Limper 2004; Calderón *et al.* 2010; Catherinot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011). A auscultação é muitas vezes normal (Huang *et al.* 2006).

No doente seropositivo para VIH a evolução destes sintomas pode ser mais lenta, 25 a 28 dias após a infecção, caracterizada como subaguda, o que pode retardar o diagnóstico (Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Catherinot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011; Varela *et al.* 2011). A manifestação da doença acontece geralmente quando a contagem de células T CD4⁺ é inferior a 200 células/mm³ (Phair *et al.* 1990; Thomas & Limper 2004; Huang *et al.* 2006; Catherinot *et al.* 2010). Ainda pode surgir emagrecimento, astenia e suores nocturnos (Engelberg *et al.* 1984), bem como pneumonia intersticial aquando do estabelecimento da infecção (Kovacs *et al.* 1984).

Já no doente imunocomprometido seronegativo para VIH, a sintomatologia da PPc surge de forma súbita, e a infecção evolui rapidamente em alguns dias para a insuficiência respiratória aguda (Bartlette & Smith 1991; Walzer 2002; Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Catherinot *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011; Li *et al.* 2014).

A radiografia do tórax caracteriza-se por um infiltrado bilateral intersticial difuso, que predomina na região peri-hilar, tornando-se mais homogéneo com a evolução da doença. Outros aspectos podem igualmente ser observados, como lesões cavitárias ou

quísticas, nódulos, infiltrados intersticiais localizados ou unilaterais, e pneumotórax (Wazir & Ansari 2004; Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011), os quais parecem estar relacionados com a administração da profilaxia para a PPc, particularmente a pentamidina em aerossol (Jules-Elysee *et al.* 1990; Thomas & Limper 2004).

Devido à sua grande sensibilidade, a tomografia computadorizada de alta resolução pode ser útil em algumas situações, nomeadamente quando não são observadas alterações na radiografia ao tórax (Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Catherinot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011; Varela *et al.* 2011). O achado mais característico dos doentes com PPc é a presença de um exsudado intra-alveolar espumoso, que produz na tomografia um padrão em “vidro fosco”, bem como o espessamento de septos intralobulares, reflectindo a infiltração intersticial por edema ou lesões quísticas (Marchiori *et al.* 2001).

A avaliação laboratorial de rotina com base em análises bioquímicas, hematológicas e serológicas revela-se limitada e inespecífica para o diagnóstico da PPc. O doseamento de desidrogenase láctica (LDH, do inglês *lactase dehydrogenase*) no soro tem-se revelado um método útil no diagnóstico de *P. jirovecii*, pois embora, não sendo um marcador específico da doença, permite, frequentemente, registar níveis elevados daquela enzima (Smith *et al.* 1988). Também é frequente encontrar nos doentes com PPc diminuição da pressão parcial de oxigénio arterial (PaO₂), que conduz a hipoxemia (Calderón *et al.* 2010).

Quando a apresentação clínica de PPc é acompanhada pela presença de outras doenças de base e suas complicações, o diagnóstico pode tornar-se um desafio, uma vez que, o quadro clínico pode revelar-se mais atípico e confuso e o diagnóstico diferencial difícil (Chuang *et al.* 2007).

Aproximadamente 13 a 18% dos doentes seropositivos para VIH com diagnóstico de PPc apresentam outras causas correntes de disfunção pulmonar, como tuberculose (TB), sarcoma de Kaposi (SK), ou pneumonia bacteriana (Baughman *et al.* 1994; Shebl *et al.* 2010). TB e PPc podem exhibir aspectos clínicos e radiológicos sobreponíveis, podendo ocorrer inclusivamente co-infecção (Orlovic *et al.* 2001; Boondireke *et al.* 2010).

Ainda que de forma rara, com percentagens inferiores a 3%, encontram-se descritos alguns casos da presença deste agente patogénico em outros órgãos a partir do pulmão,

sugerindo assim a disseminação sistémica (Cohen *et al.* 1991; Ng *et al.* 1997; Fujii *et al.* 2007; Karam *et al.* 2014). A PPc extrapulmonar pode afectar uma variedade de órgãos e tecidos, como o fígado, o timo, o baço, o globo ocular, o sistema auditivo, a medula óssea, o coração, a tiróide, os rins, o aparelho gastrointestinal, o córtex cerebral, os gânglios linfáticos e a pele; a disseminação parece ocorrer por via linfática e sanguínea (Ng *et al.* 1997; Munksgaard 2004; Wazir & Ansari 2004; Fujii *et al.* 2007; Varela *et al.* 2011). Nos indivíduos seronegativos para VIH, a difusão da doença, a ocorrer, dá-se imediatamente no estágio *pré-mortem*, e muitas vezes estes doentes falecem da patologia subjacente, não sendo a PPc extrapulmonar clinicamente evidente (Ng *et al.* 1997). Relativamente aos doentes seropositivos para VIH, estas manifestações são raras, reportadas apenas em casos muito específicos (Munksgaard 2004), sendo as mais frequentes as lesões oftalmológicas da coróide e do sistema auditivo, e com melhor prognóstico do que a PPc disseminada (Ng *et al.* 1997). A disseminação da infecção pode ocorrer ainda em situações de acentuada imunossupressão, em doentes a fazer profilaxia com pentamidina por inalação ou sem qualquer tipo de terapêutica (Grashand *et al.* 1997; Ng *et al.* 1997; Walzer 2002).

Pneumocystis é um microrganismo oportunista clássico, que causa doença ligeira ou inexistente em hospedeiros imunocompetentes; no entanto, em hospedeiros imunocomprometidos pode resultar numa insuficiência respiratória fulminante quando sem terapêutica adequada (Gigliotti & Wright 2012). Na ausência de uma abordagem clínica específica, as características apresentadas podem ser confundidas com infecções concomitantes por outros microrganismos, ou mesmo por complicações da patologia subjacente (Hughes 1994).

1.5.2 Patologia e patogénese

As primeiras descrições da interacção de *P. jirovecii* com as células do hospedeiro foram baseadas na observação de lesões pulmonares em cortes histológicos de pulmão, corados pela hematoxilina-eosina. A presença de um exsudado espumoso/algodonoso eosinofílico com aspecto em “favo de mel” no interior dos alvéolos pulmonares - molde alveolar, era descrito como patognomónico da PPc. A presença dos quistos podia ser confirmada através da aplicação de colorações citoquímicas em amostras desse exsudado (Smith & Bartlett 1991).

No pulmão, *P. jirovecii* adere às células epiteliais do alvéolo pulmonar, os pneumócitos de tipo I, onde prolifera na forma de trofozoítos através da interdigitação das suas membranas com as do hospedeiro, podendo desencadear, inclusivamente, a descamação da superfície alveolar (Yoneda & Walzer 1983; Yoshida 1989). Esta aderência é promovida pela interação com as proteínas fibronectina e a vitronectina do hospedeiro, que se ligam à superfície do parasita e permitem a incorporação de receptores de integração que estão presentes no epitélio alveolar. No tecido infectado, os pneumócitos de tipo I, em contacto com o microrganismo podem aparecer vacuolizados e com sinais de erosão (Beck & Harmsen 1998). Tem sido também aventado que, os pneumócitos do tipo II são por vezes igualmente afectados, e que na ausência de tratamento pode inclusivamente ocorrer a destruição destes (Long *et al.* 1986). A proliferação dos trofozoítos, a formação de quistos e a resposta do hospedeiro às lesões do tecido pulmonar, conduzem então ao preenchimento dos alvéolos por um exsudado espumoso (**Figura 5.A.B**) (Bartlett & Smith 1991), explicando, a dispneia como uma das primeiras manifestações da PPc (Macfarlane & Finch 1985).

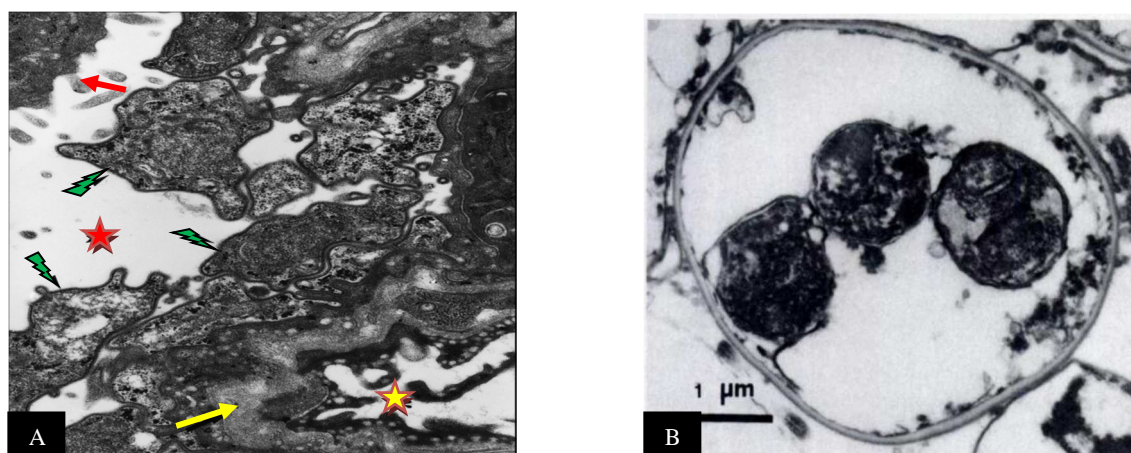


Figura 5 - Imagens de microscopia electrónica em condições de elevada osmolaridade. **A**-Trofozoítos (setas verde), lúmen alveolar (estrela vermelha), lúmen capilar (estrela amarela), microvilosidades das células epiteliais (seta vermelha), membrana basal (seta amarela) (Adaptado de Dei-Cas *et al.* 1998). **B**-Préquistos com três corpos intraquísticos (Adaptado de Ishida *et al.* 1994).

A resposta gerada pelo hospedeiro na presença de *P. jirovecii* constitui uma interacção complexa entre as células epiteliais, a membrana basal, os macrófagos alveolares, os

polimorfonucleares neutrófilos, os linfócitos T CD4⁺ e os mediadores solúveis (Huang *et al.* 2006; Vedy *et al.* 2009).

Estudos realizados em modelos animais revelaram que é necessário ocorrer uma resposta inflamatória pulmonar para o controlo da PPc (Castro & Morrison-Bryant 2010). Nas situações de PPc grave, verifica-se a ocorrência de intensos infiltrados de polimorfonucleares neutrófilos nos pulmões, que podem resultar em danos no tecido alveolar e consequentemente insuficiência respiratória. De facto, a evolução da doença está mais relacionada com a gravidade da inflamação, do que propriamente com a carga parasitária, inflamação essa que, quando muito exuberante, pode provocar sérias lesões nos pulmões durante a infecção, nomeadamente, edema, desenvolvimento de membranas hialinas e fibrose intersticial (Limper *et al.* 1989; Thomas & Limper 2004; Miller *et al.* 2013); hipertrofia dos pneumócitos do tipo II, é também frequentemente observada, como forma de reparação tecidular (Miller *et al.* 2013). *Pneumocystis* pode ocasionalmente promover outros tipos de resposta por parte do hospedeiro, nomeadamente lesões granulomatosas (Cruickshank 1975; Blumenfeld *et al.* 1988) e cavitárias (Eng *et al.* 1987; Pincus *et al.* 1987). Todavia, indivíduos seropositivos para VIH podem apresentar características clínicas e morfológicas de lesões pulmonares sem evidência do agente (Ramaswamy *et al.* 1985).

A resposta imunitária central está associada aos linfócitos T CD4⁺, uma vez que são responsáveis pela activação de células efectoras da resposta inflamatória; assim sendo, o risco de infecção aumenta quando os valores de linfócitos T CD4⁺ são inferiores a 200/mm³ (Phair *et al.* 1990). Contudo, perante a ausência de um número suficiente de linfócitos T CD4⁺ para controlo da infecção, os linfócitos T CD8⁺ iniciam a sua resposta hiper-inflamatória, causando severos danos, sem redução do número de microrganismos (Castro & Morrison-Bryant 2010). A fagocitose das células infectadas é realizada pelos macrófagos alveolares, cuja função se poderá encontrar já alterada, em hospedeiros imunocomprometidos com outras patologias subjacentes (Koziel *et al.* 1998).

Na ausência de profilaxia após tratamento do primeiro episódio, os doentes seropositivos para VIH muitas vezes desenvolvem episódios secundários de PPc (De Lorenzo *et al.* 1985). Esses episódios podem resultar da viabilidade de microrganismos da infecção inicial, logo uma reactivação, demonstrando assim resistência à terapêutica, ou através de uma reinfeção. Segundo alguns estudos, da comparação microscópica de

amostras respiratórias de seropositivos e seronegativos para VIH que desenvolveram PPc, embora os doentes seropositivos para VIH apresentem maior número de *P. jirovecii* no tecido pulmonar, o processo inflamatório é mais exacerbado nos doentes seronegativos para VIH, e composto essencialmente por polimorfonucleares neutrófilos e raros macrófagos, levando a diminuição da pressão de oxigénio arterial e podendo inclusivamente conduzir à morte do hospedeiro por insuficiência respiratória grave (Fleury *et al.* 1985; Limper *et al.* 1989; Touze *et al.* 1991).

1.5.3 Pneumonia por *P. jirovecii*

PPc ou pneumocistose é a designação atribuída à pneumonia desencadeada por *Pneumocystis* em humanos e outros mamíferos. Inicialmente apelidado de *P. carinii* em homenagem a António Carini, em 1994, em resposta a uma série de dados obtidos por biologia molecular, bem como com base em estudos de infecção cruzada, o fungo que infectava o homem passou a designar-se *P. carinii f. sp. hominis*. Já no fim da década de noventa um sistema binomial foi proposto, passando a designar-se de *P. jirovecii*. Actualmente, a sigla PPc representa Pneumonia por Pneumocystis (Miller & Huang 2004).

Pneumocystis jirovecii é a principal causa de pneumonia grave e por vezes fatal em imunocomprometidos, já que é responsável por causar infecções oportunistas específicas no aparelho respiratório dos humanos (Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002).

O reconhecimento de *Pneumocystis* como agente etiológico da PPc ocorreu nos anos cinquenta do século passado através da observação, identificação e confirmação do microrganismo em tecido pulmonar de crianças com patologia pulmonar, na altura designada por pneumonia intersticial (Kovacs *et al.* 2001). Hughes *et al.*, num estudo realizado em ambiente hospitalar verificaram a presença da PPc, em 17 crianças com patologia maligna, em que a leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituía a maior condição predisponente (Hughes *et al.* 1973).

Nos anos oitenta do século passado, a pandemia de VIH e as elevadas taxas da PPc, colocaram o foco na pesquisa e compreensão de *Pneumocystis* no meio científico (Kaneshino & Limper 2011). Contudo, a PPc continua a ocorrer em pessoas com VIH/sida não diagnosticado, ou sem assistência médica, doentes que não fazem

profilaxia para a PPc, nos que são resistentes à TARVc, e ainda em imunocomprometidos seronegativos para VIH com diferentes graus de imunodeficiência.

A mortalidade entre os seropositivos para VIH com PPc grave, contínua alta, estimando-se entre 29 a 62% nos doentes admitidos nos cuidados intensivos (Dickson Sj *et al.* 2007; Radhi *et al.* 2008). Os principais factores associados a mau prognóstico da PPc e ao aumento da mortalidade neste tipo de doentes incluem, a idade avançada, a necessidade de ventilação mecânica, os baixos níveis de hemoglobina, o desenvolvimento de pneumotórax, a diminuição da PaO₂, aumento no gradiente de oxigénio arterial alveolar [P(Aa)O₂], e a presença de comorbilidade médica e episódios anteriores de PPc (Morris *et al.* 2008b; Radhi *et al.* 2008; Walzer *et al.* 2008; Morris & Norris 2012). O envolvimento de outras co-infecções bacterianas, fúngicas ou virais relacionam-se igualmente com um pior desfecho clínico (Vavricka *et al.* 2004; Bento *et al.* 2013). Alguns estudos referem que uma diminuição na contagem de células T CD4⁺ está relacionada com um aumento da mortalidade, mas nem todos os trabalhos suportam tais resultados (Radhi *et al.* 2008; Morris & Norris 2012).

O número de imunocomprometidos seronegativos para VIH em risco de PPc, tem vindo a aumentar, com o aumento dos casos de transplante de órgãos, introdução dos agentes inibidores anti-TNF- α (Saito *et al.* 2004; Morris & Norris 2012) e o uso continuado de corticosteroides (Yale & Limper 1996; Genvresse *et al.* 1998; Vavricka *et al.* 2004). No entanto, o número absoluto de casos de PPc é ainda muito menor e a profilaxia mais eficaz, relativamente aos seropositivos para VIH (Rodriguez & Fishman 2004; Green *et al.* 2007). A mortalidade entre o grupo dos imunocomprometidos seronegativos para VIH com PPc, apresenta-se de uma forma geral superior em relação aos infectados por VIH, com taxas de aproximadamente 53% (Thomas & Limper 2004; Enomoto *et al.* 2010), provavelmente como resultado secundário a uma acentuada resposta inflamatória pulmonar por parte do hospedeiro (Limper *et al.* 1989; Monnet *et al.* 2008). Como principais factores predisponentes, temos o desenvolvimento de pneumotórax, intubações tardias, necessidade de longos períodos de ventilação mecânica e elevada severidade inicial da doença (Festic *et al.* 2005; Morris & Norris 2012; Kim *et al.* 2014; Kofteridis *et al.* 2014). A contagem de células T CD4⁺ revela-se ineficaz na determinação do risco da PPc, neste tipo de população, embora muitos dos indivíduos

apresentem baixos níveis de contagem aquando da doença (Festic *et al.* 2005; Enomoto *et al.* 2010). A LDH embora muitas vezes elevada não é diagnóstica (Festic *et al.* 2005). Um importante problema mundial de saúde pública surgiu com o advento de VIH/sida. A PPc tornou-se a primeira doença definidora de sida com elevada prevalência (Phair *et al.* 1990). Dados da ECDC comprovam este facto, e indicam que, ainda actualmente, a PPc continua a constituir a principal infecção oportunista definidora do estado de sida com elevada morbilidade e mortalidade, particularmente entre os adolescentes e adultos, heterossexuais e homossexuais e utilizadores de drogas, na União Europeia (**Figura 6**) (ECDC 2011).

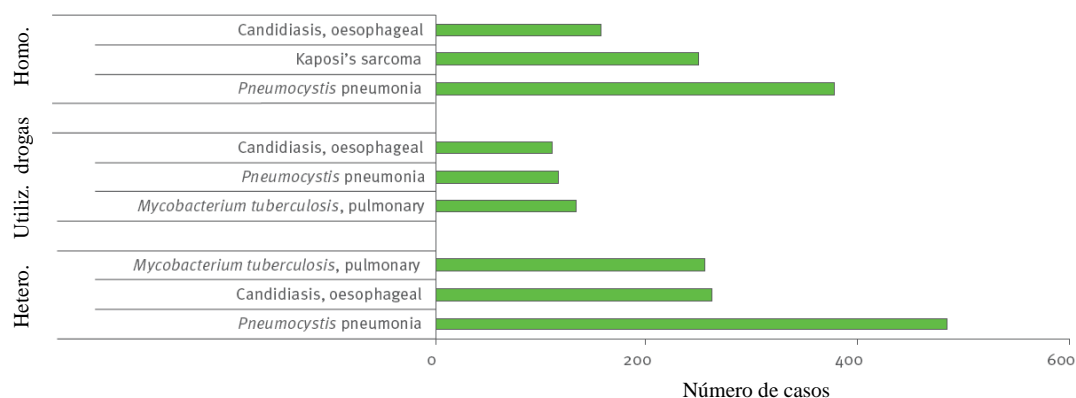


Figura 6 – Distribuição do número de casos de doentes seropositivos para VIH na União Europeia, pelas três principais doenças associadas e segundo três modos de transmissão (ECDC 2011).

1.6 Diagnóstico da pneumonia por *P. jirovecii*

1.6.1 Diagnóstico presuntivo

Um diagnóstico atempado e a implementação de uma terapêutica adequada, são essenciais para uma boa resposta clínica nos casos da PPc, em qualquer hospedeiro imunocomprometido (Rodriguez & Fishman 2004).

O diagnóstico presuntivo da PPc tem por base o enquadramento de diversos dados, nomeadamente o quadro clínico do doente, os testes de função pulmonar e a gasimetria arterial, e os exames radiológicos e laboratoriais inespecíficos.

A apresentação clínica da PPc nos seronegativos para VIH pode diferir dos doentes com infecção por VIH (Limper *et al.* 1989). Segundo orientações do *Centres for Disease Control/Communicable Disease Surveillance Center* (CDC/CDSC), para os doentes seropositivos para VIH, os critérios de diagnóstico presuntivo da PPc são: a dispneia de esforço/tosse recente não produtiva; radiografia ao torác com infiltrado intersticial bilateral; hipoxemia arterial e ausência de evidência de pneumonia bacteriana (CDC/CDSC 1980; Rani *et al.* 2000). A evolução da PPc neste grupo tende a ser subaguda, muitas vezes envolvendo uma a duas semanas. Já nos seronegativos para VIH, os sintomas evidenciados apresentam-se mais variáveis e com um desenvolvimento mais rápido e severo, geralmente acompanhado de acentuada hipoxemia. Estes tipos de reacção, embora ainda de causa desconhecida, parecem reflectir o estado imunitário pulmonar do individuo (Rodriguez & Fishman 2004).

No exame físico, encontra-se tipicamente taquipneia, taquicardia e ausência de alterações a nível da auscultação pulmonar. Numa fase inicial os sintomas podem não ser relevantes, mas com o tempo podem evoluir para insuficiência respiratória grave (Touze *et al.* 1991). Nos testes de função pulmonar, a presença nos casos da PPc da característica hipoxemia, produz um aumento do $P(Aa)O_2$ (Rodriguez & Fishman 2004; Kim *et al.* 2014; Kofteridis *et al.* 2014).

A imagem radiográfica torácica pode revelar-se normal, apesar da significativa hipoxemia e do envolvimento difuso do parênquima (Sirotzky *et al.* 1978), podendo variar em função da patologia subjacente, do seu grau, e da presença de outras infecções concomitantes (Fishman 1994). Embora não exista um padrão radiológico característico da PPc, o aspecto clássico é um padrão intersticial bilateral, caracterizado por opacidades reticulonodulares bilaterais (Crans & Boisselle 1999).

Quando não são observadas alterações na radiografia ao tórax ou este se mostra equívoco perante doentes com suspeita clínica de PPc, o recurso à tomografia computadorizada de alta resolução pode revelar-se útil, tendo em conta a sua alta sensibilidade (Crans & Boiselle 1999; Fishman 2002), bem como testes de medicina nuclear, como a cintigrafia pulmonar com Gálio 67 (^{67}Ga), um exame muito sensível, apesar de inespecífico para a PPc, mas que localiza lesões inflamatórias (Fishman 1994, 2002; Crans & Boiselle 1999).

O doseamento da LDH embora muito sensível, não é específico da PPc, podendo, mesmo assim constituir uma ferramenta útil na avaliação do prognóstico e da resposta à terapêutica (Kagawa *et al.* 1988; Grover *et al.* 1992; Quist & Hill 1995; Butt *et al.* 2002). Segundo alguns estudos, os doentes com infecção por *P. jirovecii*, apresentam um aumento do nível de LDH, reflexo da reacção inflamatória e da lesão pulmonar causada pelo microrganismo. No entanto, outros processos pulmonares como a embolia pulmonar, linfoma e outras pneumonias também revelam uma subida do nível de LDH (Fishman 2002). Um estudo realizado em doentes seropositivos para VIH com PPc, observou que, 92% apresentavam elevados níveis de LDH (Rani *et al.* 2000).

A gasimetria arterial constitui uma importante ferramenta para o diagnóstico desta doença, fornecendo informações relevantes para estabelecer a sua gravidade e direccionar o tratamento (Walzer 2002). Este teste pode indicar hipoxemia com diminuição da PaO_2 , e aumento da P(Aa)O_2 (Speich *et al.* 1992; Walzer 2002).

Os testes sero-imunológicos acarretam algumas limitações, tendo em conta a alta percentagem de portadores de anticorpos anti-*P. jirovecii* na população em geral, comportando por isso, um maior risco de, devido a reacções cruzadas com outros agentes, apresentarem falsos positivos. Para além disso, a eficácia do diagnóstico e do tratamento é dificultada pelo facto de a metodologia em causa não conseguir relacionar o estado da infecção com a intensidade com que a mesma se apresenta, não permitindo, assim, uma diferenciação entre infecções prévias e recém-adquiridas (Morris & Norris 2012).

1.6.2 Diagnóstico definitivo

A inexistência de uma abordagem clínica universal em doentes com suspeita clínica da PPc, torna na maioria dos casos, o diagnóstico definitivo essencial para a confirmação

precoce da doença e instituição da terapêutica adequada (Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2011). Este diagnóstico pode revelar-se difícil em indivíduos imunocomprometidos, devido à inespecificidade dos sinais e sintomas, dos achados radiológicos, assim como da frequente coexistência de infecções oportunistas com múltiplos outros microrganismos, de outras doenças associadas, e a potencial toxicidade dos agentes utilizados para o tratamento dos doentes seropositivos para VIH (Rodriguez & Fishman 2004; Thomas & Limper 2004). O diagnóstico definitivo da PPc tem por base a observação microscópica de *Pneumocystis* em amostras biológicas respiratórias (Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2011).

1.6.2.1 Amostras biológicas

As amostras biológicas respiratórias utilizadas no diagnóstico definitivo da PPc podem ser divididas em: amostras obtidas por técnicas não invasivas, como a expectoração espontânea (EE) ou induzida (EI), o aspirado nasofaríngeo ou o lavado oral (LO), e por técnicas invasivas, como a biópsia pulmonar (BP), a biópsia transbrônquica (BTB), o lavado broncoalveolar (LBA), a secreção brônquica (SB), e o escovado brônquico (EB). Em 1897, Killian introduziu na prática médica o broncoscópio. Com a introdução do instrumento de fibra óptica, em 1996, por Ikeda, houve um aumento do alcance do equipamento e, conseqüentemente, do potencial diagnóstico. A broncofibroscopia permite a visualização da árvore brônquica. O desenvolvimento de pinças, cateteres e escovas possibilitou uma amplificação diagnóstica, através da obtenção de amostras representativas do parênquima pulmonar para diagnóstico cito-histopatológico, microbiológico e imunológico, através das técnicas de BP, BTB, LBA, SB e EB (Zavala 1975; Da Silva & Tomio 2005; Moreira *et al.* 2010). Muito do valor da broncoscopia depende fundamentalmente do alcance diagnóstico a partir da adequada colheita, preparação e análise do maior número e volume possível de amostras biológicas (Moreira *et al.* 2010).

O **Quadro 3** apresenta alguns dos tipos de amostras biológicas utilizadas no diagnóstico da PPc, referências bibliográficas e percentagens de detecção.

Quadro 3. Tipo de amostras biológicas utilizadas no diagnóstico da PPc, referências bibliográficas e respectivas percentagens de detecção (Adaptado de Rodriguez & Fishman 2004).

Tipo de amostra ^a	Referência bibliográfica	%
EE	Walzer <i>et al.</i> 1974; Lau <i>et al.</i> 1976	Baixa
EI	Kovacs <i>et al.</i> 1988; Fishman 2002	30-55
EI/Imunofluorescência	Kovacs <i>et al.</i> 1988; LaRocque <i>et al.</i> 2003	60-97
LBA	Stover <i>et al.</i> 1984; Fishman 2002	80-95
LBA e BTB	Broaddus <i>et al.</i> 1985; Fishman 2002	> 95
BP	Rossiter <i>et al.</i> 1979	> 95

^a EE, expectoração espontânea; EI, expectoração induzida; LBA, lavado broncoalveolar; BTB, biópsia transbrônquica; BP, biópsia pulmonar.

A BP representa o método *gold standard* de diagnóstico laboratorial na avaliação do processo pulmonar nos hospedeiros imunocomprometidos (Rodriguez & Fishman 2004), e geralmente é realizada com o auxílio de uma pinça endoscópica (Moreira *et al.* 2010). O diagnóstico de fragmentos de tecido pulmonar, permite a observação do microrganismo em mais de 95% dos casos de infecção (Rossiter *et al.* 1979; Baughman 1994). Também a BTB permite a identificação de *P. jirovecii* em mais de 95% dos casos, devendo ser considerada principalmente nos seronegativos para VIH com forte suspeita de PPc e LBA negativos (Broaddus *et al.* 1985; Fishman 2002). A colheita do líquido do LBA é realizada por broncofibroscopia com encravamento do fibroscópio no lobo médio, instilação de uma solução salina, e posterior aspiração (Gosey *et al.* 1985). Dada a sua elevada sensibilidade, esta é a técnica mais utilizada no diagnóstico de infecções fúngicas, nomeadamente da PPc em imunocomprometidos (Miller *et al.* 1991; Ribes *et al.* 1997; Arcenas *et al.* 2006; Linssen *et al.* 2006; Huggett *et al.* 2008; Botterel *et al.* 2012; MacTaggart *et al.* 2012). A análise do líquido do LBA permite, segundo alguns estudos, o diagnóstico em mais de 80% de todos os doentes com PPc e em mais de 95% em doentes com infecção por VIH (Rodriguez & Fishman 2004; Fan *et al.* 2013). Trata-se, contudo, de um procedimento dispendioso, invasivo e que envolve riscos secundários, como o pneumotórax (Baughman *et al.* 1991). A SB constitui a simples aspiração de secreção nos brônquios principais da árvore brônquica durante a broncoscopia. No entanto, em alguns casos, pode existir a necessidade de instilação de uma solução salina, com o intuito de auxiliar na remoção das secreções, estimulando a

tosse e fluidificando as secreções espessas (Matos 1999; Moreira *et al.* 2010). Já o EB é mais utilizado para lesões localizadas suspeitas, as quais são escovadas via endoscópica, evitando áreas necrosadas (Moreira *et al.* 2010). A expectoração é uma amostra biológica que pode ser obtida espontaneamente ou de uma forma simples que não requer equipamento específico. Representa um método não invasivo, de baixo custo, que comporta um baixo risco de complicações, as quais, a existirem, são predominantemente transitórias e desprovidas de gravidade (Bigby *et al.* 1986; Kovacs *et al.* 1988; Kirsch *et al.* 1990; Nowaseb *et al.* 2014). A EE recolhida por rotina para cultura de agentes bacterianos e fúngicos, raramente é diagnóstica em casos de PPc (Lau *et al.* 1976). Por sua vez, a EI baseia-se no conceito de que, alterações no microambiente das vias aéreas como o pH e a osmolaridade, bem como a activação de mediadores inflamatórios, podem de forma aguda aumentar a secreção e tornar possível a obtenção de amostras em doentes que originalmente apresentavam tosse improdutiva (Da Silva & Tomio 2005). A EI é obtida pela inalação de uma solução salina hipertónica (um soro salino a 1,8%, durante 10 a 15 minutos, com um nebulizador ultrassónico, que promove a transudação e a exfoliação traqueobrônquica) tem-se revelado útil no diagnóstico da PPc em imunocomprometidos; trata-se de um método menos invasivo, com menor desconforto e risco para o doente, bem como custos mais reduzidos (Bigby *et al.* 1986; Kovacs *et al.* 1988). Esta técnica permite a detecção do agente em 30 a 55% dos casos de infecção, após a coloração com corantes não específicos, por vezes de difícil interpretação (Ng *et al.* 1989; Rodriguez & Fishman 2004). O problema da baixa sensibilidade foi ultrapassado com a associação à imunofluorescência (IF) com anticorpos monoclonais (AcM) anti-*P. jirovecii*, fixando-se a percentagem de detecção entre 60 a 97% dos casos de infecção (Kovacs *et al.* 1988; Baughman *et al.* 1989; Ng *et al.* 1990a, 1990b; Matos *et al.* 1995). Actualmente, a aplicação de técnicas de biologia molecular, revelam-se promissoras, mas ainda sem fácil e amplo acesso (Caliendo *et al.* 1998). A EI apresenta uma sensibilidade superior comparativamente à EE, no entanto, alguns estudos verificaram que o limite de detecção de *P. jirovecii* neste tipo de amostras é baixo, relativamente a outras amostras biológicas obtidas por métodos invasivos (Elvin *et al.* 1988). Com o objectivo de procurar obter amostras de forma pouco invasivas e com maior sensibilidade, alternativas à expectoração têm sido estudadas, sobretudo através de lavados da

orofaringe e orais (Wakefield *et al.* 1993; Helweg-Larsen *et al.* 1997; Matos *et al.* 2001), todavia, os resultados recolhidos tem demonstrado ainda baixa sensibilidade. O LO é obtido por gargarejamento com um soro salino.

Estudos recentes demonstraram que o líquido do LBA constitui o tipo de amostra biológica respiratória mais sensível, para o diagnóstico de infecções fúngicas, em indivíduos imunocomprometidos com diferentes tipos de imunodeficiência, sendo por isso recomendado no diagnóstico da PPc (Miller *et al.* 1991; Da Silva *et al.* 2007). Em indivíduos sujeitos a agentes profiláticos, como é o caso da pentamidina, o número de microrganismos pode diminuir e ou a sua distribuição no pulmão se encontrar alterada, reduzindo assim a sensibilidade diagnóstica da amostra e modificando a apresentação clínica da infecção (Bigdy *et al.* 1986; Jules-Elysee *et al.* 1990).

1.6.2.2 Métodos laboratoriais tradicionais de diagnóstico

Técnicas citoquímicas

Devido à incapacidade de crescimento de *P. jirovecii* em cultura *in vitro*, o diagnóstico reside na visualização do microrganismo em amostras biológicas respiratórias, principalmente o líquido do LBA, EI e tecido pulmonar (Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2011; Morris & Norris 2012), mediante a utilização de diferentes colorações. As diversas técnicas citoquímicas descritas para a identificação microscópica de formas morfológicas características do ciclo de vida de *Pneumocystis*, podem agrupar-se nas que possuem afinidade para a parede dos quistos, mas não para o seu conteúdo ou os trofozoítos, e nas que coram os trofozoítos e corpos intraquísticos, mas não os quistos (Kovacs *et al.* 1988, 2001; Ng *et al.* 1990b; Calderón *et al.* 2010).

As principais colorações tradicionais citoquímicas utilizadas são: a coloração pela metenamina prata (GMS, do inglês *gomori methenamina-silver*), a coloração pelo Giemsa, a coloração pelo azul de toluidina (TBO, do inglês *toluidine-blue O*), e a coloração fluorescente calcoflúor (Kovacs *et al.* 1988, 2001; Ng *et al.* 1990a, 1990b; Procop *et al.* 2004). Nenhum destes métodos é específico para *P. jirovecii* e a identificação baseia-se na morfologia do parasita (Procop *et al.* 2004).

Descrita por Gomori e modificada por Grocott, em 1955, a técnica pela GMS, é considerada como a técnica de referência no diagnóstico da PPc, através da coloração da forma quística redonda ou oval, com 4 a 7 µm. A parede do quisto cora de cinzento-

escuro, num fundo cinza esverdeado claro (**Figura 7.A**). Esta técnica, para além de ser onerosa e morosa, requer um profissional experiente para a leitura das preparações, uma vez que, não sendo específica, também cora outras estruturas. A coloração pela TBO (Gosey *et al.* 1985), e a coloração pelo calcoflúor (Baselski *et al.* 1990), apresentam também afinidade para os constituintes das formas quísticas, mas também não são específicas. Já a coloração pelo Giemsa (Holten-Andersen & Kolmos 1989) (**Figura 7.B**), apresenta afinidade para a observação dos trofozoítos e dos corpos intraquísticos no interior dos quistos. Embora de fácil e rápida execução, a técnica de Giemsa permite a identificação de outros microrganismos, a sua leitura é difícil, requerendo um técnico experiente (Hughes 2001; Kovacs *et al.* 2001; Calderón *et al.* 2010).

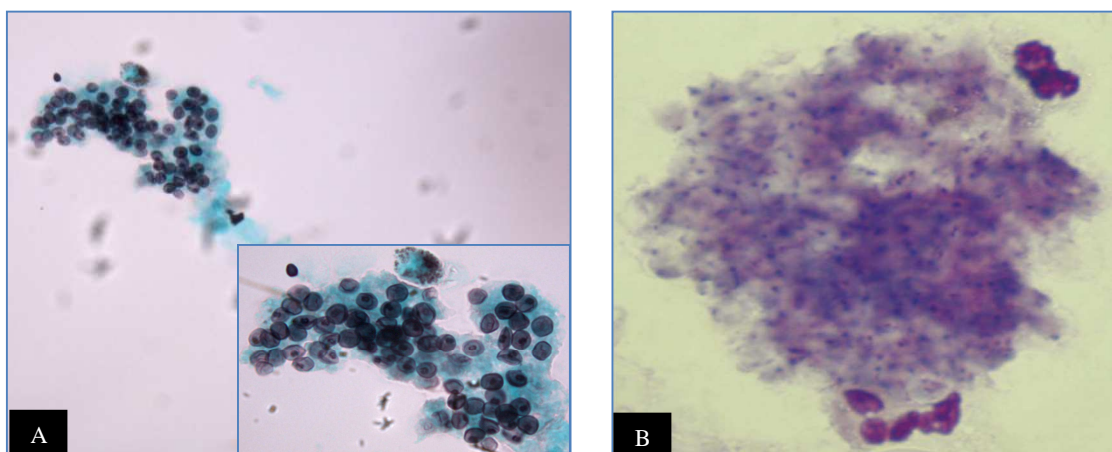


Figura 7 – Identificação microscópica de formas morfológicas de *Pneumocystis* em amostras respiratórias, utilizando diferentes técnicas de coloração. **A** – Quistos (GMS 400X e 1000X) [Gentilmente cedido pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Egas Moniz (HEM) – Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (CHLO) - fotografias da autora]; **B** – Trofozoítos (Giemsa 1000X) (Adaptado de Vedy *et al.* 2009).

Todas as técnicas enunciadas apresentam diversas limitações (Morris & Norris 2012). A sua inespecificidade, sobretudo pela grande variedade de estruturas morfológicas que poderão ser observadas semelhantes às formas de *Pneumocystis*, conduzem a uma enorme subjectividade (Gill *et al.* 1987; Elvin *et al.* 1988; Ribes *et al.* 1997) Assim sendo, a eficácia e sensibilidade destas técnicas relacionam-se consideravelmente com vários factores, dependendo fundamentalmente, da experiência dos profissionais, do que executa o protocolo da técnica e do que procede à leitura da preparação, do tipo de

amostra biológica utilizada e da quantidade de microrganismos presentes na mesma (Ribes *et al* 1997; Helweg-Larsen 2004; Calderón *et al.* 2010). A coloração de Papanicolaou (PAP) (**Figura 8.A.B**), apesar de se encontrar mais indicada para a observação de alterações na morfologia celular, pode e permite também a identificação de *P. jirovecii* (Cordani *et al.* 2008; Miller *et al.* 2013).

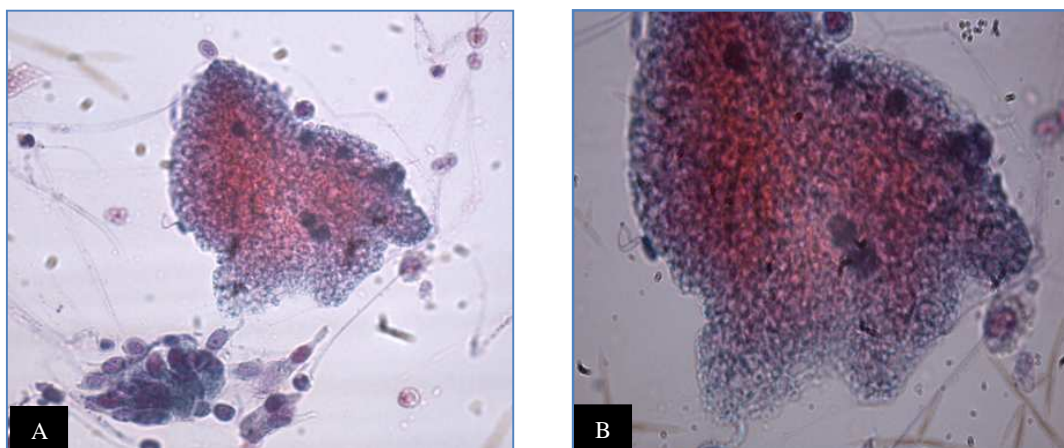


Figura 8 – Identificação microscópica de quistos de *P. jirovecii* em SB pela técnica de PAP: **A** - 400X; **B** - 1000X (Gentilmente cedido pelo Serviço de Anatomia Patológica do HEM - CHLO - fotografias da autora).

Técnicas de imunofluorescência

Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais (AcM) específicos para *P. jirovecii* em 1986, técnicas de IF directa e indirecta, começaram a ser implementadas no diagnóstico da PPc (Kovacs *et al.* 2001), tendo sido consideradas mais sensíveis e específicas do que os outros métodos tradicionais (Elvin *et al.* 1988; Kovacs *et al.* 1988; Baughman *et al.* 1989; Ng. *et al.* 1990a, 1990b; Olsson *et al.* 1993; Matos *et al.* 1995; Ribes *et al.* 1997) ou, pelo menos, tão sensíveis quanto os outros (Lautenschlager *et al.* 1996).

Esta técnica imuno específica tem como base AcM que reconhecem proteínas na parede celular de *Pneumocystis* em qualquer estágio do seu ciclo de vida. Os anticorpos (Ac) anti-*Pneumocystis* conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ligam-se a antígenos (Ag) específicos de *Pneumocystis*, que quando expostos a um determinado comprimento de onda, emitem fluorescência verde-maçã característica. A especificidade

deste tipo de técnicas aumenta quando a amostra é sujeita a digestão enzimática, que proporciona a exposição dos Ag existentes na parede quística do parasita aos Ac (Lautenschlager *et al.* 1996). Esta técnica caracteriza-se por ser sensível, específica, rápida e de fácil execução, detectando tanto trofozoítos como os quistos de *P. jirovecii* (Matos *et al.* 1995), que se apresentam corados de verde fluorescente (**Figura 9**). A principal desvantagem deste método está relacionada com os elevados custos que acarreta, nomeadamente equipamento apropriado, como um microscópio de fluorescência, bem como a presença de um profissional experiente (Baughman *et al.* 1991). Ainda assim, actualmente a IF com AcM é considerada, como a técnica de referência (Gill *et al.* 1987; Elvin *et al.* 1988; Olsson *et al.* 1993; Jarboui *et al.* 2009).

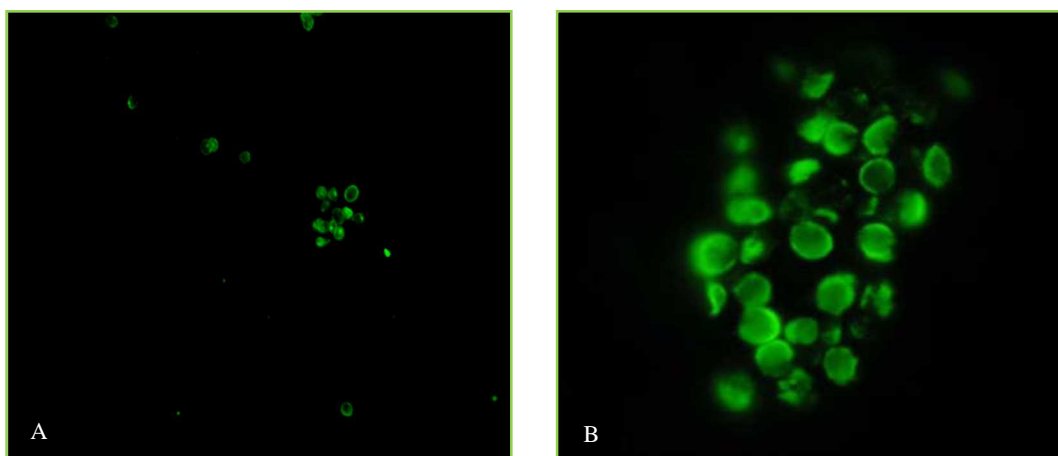


Figura 9 – Identificação microscópica de quistos de *P. jirovecii* em LBA pela técnica de IFI/AcM: **A** - 400X; **B** – 1000X (Gentilmente cedido pelo laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, da UEIPM do IHMT-UNL).

1.6.2.3 Métodos moleculares de diagnóstico

O desenvolvimento de métodos de biologia molecular, e a sua aplicação na caracterização genética de *Pneumocystis*, tem contribuído largamente para uma melhor compreensão da infecção por *P. jirovecii* (Hughes 2001; Kovacs *et al.* 2001; Tosun *et al.* 2013). As técnicas baseadas na PCR apresentam elevada sensibilidade e especificidade, permitindo a identificação de infecções com um reduzido número de microrganismos, em amostras biológicas de colheita pouco invasiva e possibilidade de processamento de um elevado número de amostras simultaneamente (Roux *et al.* 1994;

Sing *et al.* 1999; Kovacs *et al.* 2001; Wakefield 2002; Matos *et al.* 2006; Jarboui *et al.* 2009; Kaneshino & Limper 2011; Mu *et al.* 2011).

Estes métodos possibilitam a detecção de microrganismos em amostras de SB, LBA, EB, EI, EE, aspirados nasofaríngeos, sangue, soro e amostras do ambiente, como é o caso da água, ar e solo (Wakefield *et al.* 1990a; Wakefield 1996, 2002; Olsson *et al.* 1998; Matos *et al.* 1999, 2000). Assim sendo, a amplificação *in vitro* por PCR, permite detectar DNA específico de um determinado microrganismo.

Os primeiros protocolos da técnica de PCR para detecção de DNA específico de *Pneumocystis*, datam da década de noventa do século passado, por Wakefield *et al.*, e consistiam na amplificação de um fragmento, que codifica o rRNA mitocondrial, um gene multicópia (Wakefield *et al.* 1990a, 1990b). Desde então, têm sido descritas diversas variantes à técnica de PCR, com o objectivo de amplificar várias sequências de DNA do genoma de *Pneumocystis*, como a família de genes das MSG (Helweg-Larsen *et al.* 2002; Larsen *et al.* 2002; Flori *et al.* 2004; Linssen *et al.* 2006; Fillaux *et al.* 2008); o gene que codifica a enzima DHPS (Huang *et al.* 2000; Alvarez-Martínez *et al.* 2006; Linssen *et al.* 2006; Jiancheng *et al.* 2009; Matos & Esteves 2010a); a DHFR (Edman *et al.* 1989a; Lu *et al.* 1995; Costa *et al.* 2006); as regiões ITS dos genes que codificam o rRNA nuclear (Lee *et al.* 1993; Lu *et al.* 1995; Matos *et al.* 2003b); o gene que codifica a *mtLS rRNA* (Wakefield *et al.* 1990a; 1990b; Lu *et al.* 1995; Wakefield 1996; Helweg-Larsen *et al.* 2002; Matos *et al.* 2003a, 2006; Flori *et al.* 2004; Grupta *et al.* 2009; Jiancheng *et al.* 2009; Choukri *et al.* 2010; Alanio *et al.* 2011); a *mtSSU rRNA* (Helweg-Larsen *et al.* 2002); o gene que codifica a subunidade 5S do rRNA nuclear (Kitada *et al.* 1991a, 1991b; Lu *et al.* 1995; Ribes *et al.* 1997); um fragmento da sequência que codifica a enzima TS (Olsson *et al.* 1993; Lu *et al.* 1995); a β -TUB (Brancart *et al.* 2005; Rohner *et al.* 2009); o gene multifuncional *arom* (Banerji *et al.* 1995); o gene nuclear de cópia única *KEX1* (Esteves *et al.* 2009; Rohner *et al.* 2009); e o gene *cdc2* (*cyclin-dependent kinase*) (Kaiser *et al.* 2001; Arcenas *et al.* 2006; Doskaya *et al.* 2011). O locus mais frequentemente utilizado para a detecção de DNA de *P. jirovecii* por PCR é o gene *mtLSU rRNA* (Wakefield *et al.* 1990b; Lee *et al.* 1993; Lu *et al.* 1995; Beard *et al.* 2004; Grupta *et al.* 2009; Dimonte *et al.* 2013).

Uma das técnicas clássicas de PCR que tem vindo a ser optimizada em amostras biológicas para detecção de *P. jirovecii* é a *nested*-PCR (Evans *et al.* 1995;

Rabodonirina *et al.* 1997; Kovacs *et al.* 2001). Trata-se de um método auxiliar ao diagnóstico convencional, particularmente sensível, uma vez que, se torna possível a detecção de DNA em amostras com baixa carga parasitária, dificilmente detectada através das técnicas parasitológicas habituais (Tamburrini *et al.* 1993; Matos *et al.* 2000). A *nested*-PCR baseia-se em duas fases consecutivas de amplificação, aumentando a sua sensibilidade quando direccionada para a amplificação de genes de multicópia, como é o caso dos genes mitocondriais (Weig *et al.* 1997; Kovacs *et al.* 2001; Jarboui *et al.* 2009). Por isso, é frequentemente utilizada no diagnóstico da PPc, particularmente, na identificação de casos de colonização e ainda em estudos de genotipagem (Khodadadi *et al.* 2013).

Recentemente, a técnica de PCR quantitativo ou PCR em tempo real (RT-qPCR, do inglês *real-time* PCR) (Larsen *et al.* 2002; Flori *et al.* 2004; Linssen *et al.* 2006; Fillaux *et al.* 2008; Esteves *et al.* 2009, 2012; Rohner *et al.* 2009), tem-se revelado uma ferramenta promissora, uma vez que, permite monitorizar o progresso de uma reacção de PCR à medida que esta vai ocorrendo, ou seja, em tempo real, por oposição à recolha de dados apenas no final da reacção, típica da PCR convencional (Qiagen 2004-2006; Dalpke *et al.* 2013). A quantificação do DNA amplificado ao longo dos ciclos de amplificação, poderá possibilitar a distinção entre casos clínicos e portadores assintomáticos (Torres *et al.* 2000; Kovacs *et al.* 2001; Flori, *et al.* 2004; Jarboui *et al.* 2009; Calderón *et al.* 2010).

Devido à elevada sensibilidade da técnica de PCR é possível detectar um número reduzido de microrganismos, sendo por isso, muito útil na aplicação ao diagnóstico da PPc, na identificação de casos de colonização por *P. jirovecii*, em estudos de genotipagem, podendo contribuir também para a monitorização dos doentes sob terapêutica ou profilaxia (Larsen *et al.* 2002). Porém, actualmente, são mais utilizadas na investigação e como instrumentos complementares ao diagnóstico da PPc (Torres *et al.* 2000; Jarboui *et al.* 2009).

Muitos dos métodos anteriormente descritos, requerem amostras biológicas obtidas por técnicas invasivas, difíceis de realizar, principalmente em doentes com sério comprometimento respiratório, torna-se por isso importante o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico que não exijam a realização de técnicas tão invasivas para o doente, como é o caso do doseamento de (1→3)-β-D-glucano (β-

glucano) no soro (Finkelman 2010; Matsumura *et al.* 2011; Esteves *et al.* 2014b). O β -glucano é um polissacárido presente na parede dos quistos de *Pneumocystis*, bem como na parede da maioria dos fungos (Finkelman 2010), sendo a sua presença no soro considerada um marcador biológico de infecções invasivas por fungos em estudos clínicos (Ketchum *et al.* 2004; Esteves *et al.* 2014b). O β -glucano desencadeia uma resposta do sistema imunitário inato a qual pode ser detectada em amostras de soro e LBA, de doentes com PPc (Finkelman 2010). Alguns estudos analisaram as características dos testes comerciais do β -glucano, e verificaram percentagens de 90 a 100% relativamente à sensibilidade e 88 a 96% de especificidade em imunocomprometidos seronegativos para VIH com pneumonia. Os diversos *cut-offs* utilizados, dependem do *kit* de β -glucano utilizado e da população em estudo (Morris & Norris 2012). Tendo em conta, o aumento dos níveis de β -glucano na presença de outras infecções fúngicas, este método torna-se útil principalmente como teste complementar em doentes com elevada suspeita da PPc (Ketchum *et al.* 2004; Morris & Norris 2012). A S-adenosilmetionina (AdoMet do inglês, *S-adenosylmethionine*) é uma molécula importante nas reacções de metilação e síntese das poliaminas de *Pneumocystis*. No entanto, porque este parasita não sintetiza AdoMet, necessita, por isso, de a obter do hospedeiro (Merali *et al.* 2000); assim sendo, tem sido postulado que, baixos níveis de AdoMet no plasma podem constituir um marcador da PPc (Skelly *et al.* 2003; Merali & Clarkson 2004). Contudo, resultados de estudos efectuados não confirmaram esta relação, não sendo o teste, por isso, recomendado para utilização clínica (Morris & Norris 2012).

1.7 Tratamento e Profilaxia

No início da epidemia do VIH, a PPc apresentava-se como uma patologia restrita a alguns grupos de doentes e pouco frequente, sendo as opções terapêuticas escassas e o prognóstico dos indivíduos com infecção por *P. jirovecii* baixo (Hughes 2001). O primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento da PPc foi a pentamidina (Ivády & Páldy 1958), seguida da pirimetamina-sulfadiazina (Frenkel *et al.* 1966), e do TMP-SMX (Hughes *et al.* 1974, 1977). Outros fármacos têm sido testados no desenvolvimento e biologia deste microrganismo (Cushion *et al.* 1985a, 1985b). Devido à rápida progressão da doença e, ainda, ao elevado índice de mortalidade, o tratamento precoce revela-se fundamental (Helweg-Larsen 2004; Varela *et al.* 2011).

A profilaxia primária é muito importante para os principais grupos de risco, tendo em conta, a potencial gravidade da infecção e a alta taxa de mortalidade. Assim sendo, actualmente, a profilaxia primária para a PPc em doentes seropositivos para VIH, incluindo as grávidas, e doentes aos quais é administrada TARVc, deve ser iniciada quando a contagem de células T CD4⁺ for inferior a 200 células/mm³, ou que apresentem história de candidíase orofaríngea (Masur *et al.* 2002; Lee 2006; CDC 2013). Indivíduos com episódios prévios da PPc devem fazer a profilaxia secundária ao longo de toda a sua vida, excepto se o sistema imunitário se restabelecer, como resultado da administração da TARVc (Thomas & Limper 2004).

As profilaxias primária e secundária devem ser descontinuadas nos doentes seropositivos para VIH que estiveram sujeitos a TARVc e apresentem valores de células T CD4⁺ superiores a 200 células/mm³ durante três meses, devendo ser reintroduzida sempre que se verifique um *deficit* (Thomas & Limper 2004). Já nos doentes seronegativos para VIH, mas sob terapêutica imunossupressora, ou que apresentem imunodeficiências subjacentes adquiridas ou congénitas, devem, também, fazer a profilaxia para a PPc. Como já foi referido anteriormente, segundo alguns estudos retrospectivos, a administração de determinadas doses de corticosteroides e por um período de oito semanas encontra-se associada a um significativo aumento do risco de PPc (Yale & Limper 1996). Observações sobreponíveis foram verificadas em doentes com cancro ou com doenças do tecido conectivo e a realizar terapêutica com corticosteroides (Sepkowitz *et al.* 1992; Sepkowitz 2002).

A estratificação da severidade da doença em ligeira, moderada ou grave, bem como a existência de condições de co-morbilidade e a tolerância do doente a determinados agentes específicos, são essenciais para a tomada de decisão, das medidas a desenvolver na altura do tratamento (Castro & Morrison-Bryant 2010; Varela *et al.* 2011; Morris & Norris 2012).

Com o advento da combinação de fármacos e a confirmação da sua eficácia na terapêutica da PPc, o TMP-SMX demonstrou ser o mais eficiente e, por isso, o de primeira linha no tratamento da PPc severa, assim como, quando a mesma ocorre durante a profilaxia em doentes imunocomprometidos seropositivos e seronegativos para VIH (Huang *et al.* 2006; Matos & Esteves 2010a; Varela *et al.* 2011; Morris & Norris 2012). O TMP-SMX é composto por dois agentes antimicrobianos, o TMP e o SMZ, que actuam sobre a via biossintética do ácido fólico, conduzindo a efeitos adversos no microrganismo (Kaneshiro & Limper 2011; Varela *et al.* 2011). O SMX, tal qual outros fármacos da família das sulfas, como a dapsona e a sulfadiazina, inibe a enzima DHPS, que catalisa a formação do ácido dihidropteroico, a partir do ácido *para*-aminobenzóico e da pteridina. Já o TMP também actua sobre a via biossintética do folato, inibindo a enzima DHFR que catalisa a reacção de formação do ácido tetrachidrofólico, a partir do ácido dihidrofólico. Esta combinação de fármacos possuem um largo espectro de acção, inibindo um grande número de agentes (Munksgaard 2004). A eficácia de tratamento varia entre 70 e 90%, em função da sua duração (Hughes *et al.* 1978, 1993), sendo geralmente bem tolerado, com rápida e boa resposta clínica (Kaneshiro & Limper 2011; Varela *et al.* 2011). A disponibilidade de terapia oral e intravenosa facilitou a sua instituição e permite o tratamento específico da PPc em qualquer dos casos (Huang *et al.* 2011; Matos *et al.* 2011).

A duração do tratamento no caso de imunocomprometidos seronegativos e seropositivos para VIH chega a ser de 14 e 21 dias, respectivamente, iniciando-se a resposta à terapêutica nos primeiros oito dias de tratamento em doentes seropositivos para VIH, e até aproximadamente ao quinto dia de tratamento nos outros imunocomprometidos seronegativos para VIH. Determinadas situações podem requerer um tratamento mais prolongado, tendo em conta, a carga parasitária presente e a resposta do sistema imunitário (Varela *et al.* 2011).

Reacções adversas são comuns, mais frequentes nos doentes seropositivos para VIH e, geralmente, surgem entre o sétimo e o 14º dia de tratamento e incluem febre, exantema, enxaqueca, insuficiência renal, entre outras (Morris & Norris 2012), estas são controladas pela redução da posologia ou por tratamento sintomático, podendo levar inclusivamente à interrupção do tratamento (Gordin *et al.* 1984).

Como alternativa ao tratamento de primeira linha em doentes que desenvolvem efeitos secundários ao TMP-SMX, ou na ausência de resposta a esta terapêutica, surge a pentamidina, primaquine-clindamicina, dapsona-trimetropim e atovaquona (Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2011; Kaneshiro & Limper 2011; Matos *et al.* 2011; CDC 2013; Esteves *et al.* 2014c). A pentamidina é uma diamidina aromática, utilizada no tratamento de algumas infecções por protozoários. Embora, igualmente eficaz comparativamente ao TMP-SMX, devido à sua toxicidade, é geralmente muito menos tolerada por parte dos doentes, desenvolvendo estes, reacções adversas, como pancreatite aguda, hipo e hiperglicemia, disfunção renal, arritmias cardíacas, limitando a sua utilização (Huang *et al.* 2006; Morris & Norris 2012). A combinação da dapsona com o TMP pode ser utilizada também como alternativa no tratamento da PPc de gravidade ligeira a moderada, quando os doentes não respondem às terapêuticas anteriormente enunciadas (Medina *et al.* 1990). Nos casos da PPc de menor gravidade, a associação primaquina-clindamicina é também recomendada (Toma *et al.* 1998). A atovaquona, uma hifroxinaftoquinona que inibe o transporte de eletrões no complexo do citocromo bc1 e, consequente, a síntese *de novo* das pirimidinas, é indicada, somente, nos casos de PPc de gravidade ligeira a moderada (Ittarat *et al.* 1995).

O tratamento adjuvante com corticosteroides é recomendado nos doentes com PPc de gravidade moderada a severa (Morris & Norris 2012). Estudos realizados demonstraram que, com o objectivo de reduzir ou prevenir a hipoxemia, a administração de corticosteroides a doentes seropositivos para VIH, com valores da PaO₂ inferiores a 70mm Hg ou um valor do P(Aa)O₂ menor que 35mm Hg, melhora o prognóstico em termos da função pulmonar e sobrevida (Bozzette *et al.* 1990; Green *et al.* 2007).

As propriedades anti-inflamatórias dos corticosteroides diminuem a inflamação e reduzem a fibrose pulmonar, que ocorre em resposta à presença dos microrganismos, prevenindo também a deteriorização do estado clínico que muitas vezes se verifica após diversos dias de tratamento. Em relação ao uso dos corticosteroides em

imunocomprometidos seronegativos para VIH, ainda poucos dados se registam (Morris & Norris 2012).

Recentemente, a utilização de um potencial novo conjunto de fármacos anti-fúngicos com novos alvos terapêuticos, nomeadamente as equinocandinas, que inibem a síntese do β -glucano, tem despertado grande interesse para o tratamento e profilaxia de *Pneumocystis* (Kamboj *et al.* 2006). No entanto, estudos realizados, utilizando o modelo animal e testando três equinocandinas, a caspofungina, anidulafungina e micafungina, as mesmas demonstraram elevada eficácia na diminuição do número de quistos, mas não de formas tróficas de parasita (Cushion *et al.* 2008, 2010; Lobo *et al.* 2013). Em termos profiláticos, esta pode ser estabelecida com o objectivo de prevenir a infecção primária, logo um primeiro episódio ou secundária, uma recaída.

O uso alargado por longos períodos de tempo, tem suscitado a possibilidade do desenvolvimento de resistências por parte de *P. jirovecii* e consequentemente a uma diminuição da eficácia da terapêutica (Morris & Norris 2012). Segundo alguns estudos, *Pneumocystis* desenvolve mutações no gene DHPS, quando sujeito à terapêutica por SMX ou dapsona (Kazanjian *et al.* 1998, 2000; Ma *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2000; Costa *et al.* 2003, 2005; Matos & Esteves 2010a). Embora, a capacidade de resistência não seja directamente testada no parasita, mutações sobreponíveis foram identificadas em bactérias após a exposição ao TMP-SMX, as quais conduziram a uma resistência à terapêutica (Huang *et al.* 2001).

OBJECTIVOS

Pneumocystis jirovecii é um fungo ubíquo de baixa virulência que pode desencadear doença respiratória grave em hospedeiros imunocomprometidos, bem como desempenhar um papel fundamental na transmissão do agente a outros indivíduos susceptíveis. Tendo em conta, a relevância actual do tema, a presente dissertação teve como principal finalidade, a detecção de *P. jirovecii* em amostras respiratórias de doentes Portugueses seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência e seropositivos para VIH; e, no período de um ano, compreendido entre 2012 e 2013, através de duas técnicas moleculares. A *nested*-PCR que foi utilizada para amplificação da região genómica *mtLSU rRNA* do fungo e a RT-qPCR para amplificação do gene nuclear que codifica a protease serina *Kexin (KEX1)*.

Assim, no presente estudo, pretendeu-se:

- i. Determinar a frequência de *P. jirovecii* entre os doentes seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência, assintomáticos para PPc, através da *nested*-PCR e RT-qPCR.
- ii. Identificar a frequência de *P. jirovecii* entre os doentes imunocomprometidos seropositivos para VIH, sintomáticos e assintomáticos para PPc, através de ambas as técnicas moleculares enunciadas.
- iii. Analisar os resultados obtidos por ambas as técnicas de PCR para as populações em estudo.
- iv. Comparar os dados obtidos da quantificação das cargas parasitárias, pela técnica de RT-qPCR, em doentes seronegativos e seropositivos para VIH.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da população em estudo

No âmbito do projecto de investigação, no qual se insere este trabalho de mestrado, no período compreendido entre os meses de Outubro de 2012 e Outubro de 2013, foram recolhidas e englobadas neste estudo 300 amostras respiratórias, entre as quais SB, LBA, EB e EE correspondentes a 300 doentes com sintomatologia respiratória.

As amostras biológicas foram recolhidas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Egas Moniz (HEM) do Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (CHLO), sendo as mesmas provenientes dos diversos serviços da referida instituição e encaminhadas para o laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica (UEIPM) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL), para processamento e diagnóstico molecular.

A utilização das amostras biológicas de doentes e a consulta da respectiva informação clínica foi devidamente aprovada pela Comissão de Ética do CHLO. De entre os dados recolhidos encontram-se, para além de informações demográficas (idade e género), o diagnóstico da patologia associada ou suspeita clínica.

Do universo de 300 indivíduos, 274 correspondem a doentes seronegativos para VIH, com outras patologias subjacentes, nomeadamente, 139 com neoplasia (8 doentes com neoplasia hematológica e 131 com neoplasia sólida), 45 com DPOC, 37 com outras pneumonias que não provocadas por *P. jirovecii*, 17 com tuberculose, 16 com doença autoimune, 9 transplantados de órgão (sete doentes submetidos a transplante renal e dois a transplante cardíaco) e 11 com outras causas (8 doentes com diabetes mellitus e três com fibrose pulmonar), todos assintomáticos para PPc. Para além das referidas amostras, foram também englobadas no estudo 26 amostras de doentes seropositivos para VIH, 10 com suspeita clínica de PPc e os restantes 16 com outras causas (seis com neoplasia, cinco com informação de insuficiência respiratória, quatro com tuberculose e um doente com DPOC).

2.2 Processamento das amostras biológicas

As 300 amostras seleccionadas para estudo e análise de dados compreendem, 228 SB, 65 LBA, quatro EB e três EE. Todas as amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas e transportadas para o laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, da UEIPM do IHMT-UNL e, posteriormente, processadas. Todo o processamento foi realizado numa câmara de fluxo laminar de forma a evitar possíveis contaminações.

2.2.1 Expectoração espontânea e secreção brônquica

Devido à natureza mucoide deste tipo de produtos biológicos, foi necessário proceder a um pré-tratamento dos mesmos. Assim, as amostras com aproximadamente 5 a 10 mL, foram transferidas para tubos de centrifuga com rosca, de 20 mL e foi adicionado igual volume de uma substância mucolítica - ditiotreitól (Sigma-Aldrich®), a 0,1% (v/v) em água destilada, seguido de agitação vigorosa no *vortex* (Velp Scientifica®) e incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ numa estufa (Heraeus), durante 30 minutos, de forma a diminuir a viscosidade através da eliminação do muco. Posteriormente adicionou-se tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate-Buffered Saline* [pH 7.2]) (BioMérieux) até perfazer o volume do tubo. A centrifugação foi efectuada na centrífuga Kubota 4000 (Kubota Corporation), a 2200 g, durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 0,5 mL de PBS e transferido para tubos *ependorf* de 1,5 mL e armazenado à temperatura de $-80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até à extracção de DNA e amplificação por técnica de PCR.

2.2.2 Lavado broncoalveolar e escovado brônquico

O processamento das amostras do líquido do LBA e EB seguem o protocolo anteriormente descrito para as amostras de EE e SB. No entanto, tendo em atenção que o líquido do LBA e EB não apresentam natureza mucoide, o pré-tratamento com ditiotreitól foi omissão.

2.3 Detecção molecular de *P. jirovecii*

De modo a proceder à detecção de *P. jirovecii*, cada uma das amostras processadas, foi submetida em duplicado a duas técnicas moleculares utilizadas no laboratório do Grupo

de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, da UEIPM do IHMT-UNL. A *nested*-PCR para detecção de DNA genómico, através da amplificação de um fragmento específico do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii* e outra a RT-qPCR, para detecção e quantificação de DNA de *P. jirovecii*, tendo como alvo o gene nuclear *KEX1*.

Tendo em conta, o risco de contaminação em qualquer ensaio de PCR, foi tida em atenção a utilização de pelo menos três áreas de trabalho distintas: a área de extracção de ácidos nucleicos; a área de preparação dos reagentes, livre de amostras biológicas ou de DNA; e a área de adição do DNA à mistura de reacção e amplificação, cada uma das áreas com material de trabalho próprio e exclusivo. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado através de radiação ultravioleta numa câmara de fluxo laminar. Nos dispositivos de pipetagem, foram utilizadas pontas com filtro, de modo a evitar a formação de aerossóis e reacções cruzadas. Os reagentes foram aliquotados e reservados em pequenos volumes. Todas as superfícies de trabalho foram devidamente limpas com desinfetante adequado antes e após a sua utilização. Em todas as fases de preparação da PCR as luvas foram mudadas com frequência, nomeadamente no movimento entre áreas de trabalho diferentes.

2.3.1 Extracção de DNA genómico

A extracção de DNA tem por base quatro fases principais, constituídas pela lise mecânica associada a propriedades de lise celular química e inactivação de nucleases, adsorção de DNA partindo das propriedades de ligação de DNA às partículas de sílica, seguido por processos de lavagens e eluição de DNA (Boom *et al.* 1990).

Para extrair o DNA genómico das amostras biológicas recolhidas e do controlo positivo (amostra respiratória previamente caracterizada como sendo positiva para *P. jirovecii*), foi utilizado o *Kit* “QIAamp® DNA Mini Kit” (Qiagen).

Este protocolo iniciou-se com a adição num *eppendorf* de 1,5 mL, de 20 µL de proteinase K (Qiagen Products), 400 µL da amostra biológica previamente processada, 200 µL do tampão de lise (*Buffer AL*). Agitou-se no *vortex*, durante aproximadamente 15 segundos de modo a facilitar a ruptura da parede quística do microrganismo, quando presente, induzida pelo *stress* físico. Após incubação a 56°C durante 10 minutos e uma centrifugação a 5800 g, durante 10 segundos, na centrífuga Kubota 3300 (Kubota Corporation), adicionou-se 200 µL de álcool 96%, seguida de nova agitação e posterior

centrifugação a 5800 g, durante um minuto. A mistura de reacção foi transferida cuidadosamente para a coluna *QIAamp Mini spin* e centrifugou-se a 5800 g, durante um minuto. O tubo contendo o sobrenadante foi desprezado e um novo recolocado. Após a passagem para a coluna *QIAamp Mini spin*, os ácidos nucleicos são adsorvidos na membrana de sílica-gel durante uma centrifugação a 5800 g, durante 10 segundos. As condições de pH e de salinidade no lisado asseguram que as proteínas e outros contaminantes, que podem inibir a PCR não fiquem retidos na membrana. Para aumentar o grau de pureza do DNA, são realizadas duas lavagens consecutivas com 500 µL cada de dois tampões de lavagem (*Buffer W1* e *W2*) e centrifugação a 5800 g, durante um minuto e por último uma centrifugação a 20600 g, durante três minutos. Finalmente, a coluna é colocada sobre um *ependorf* novo de 1,5 mL e o DNA eluído em 50 µL de tampão de eluição (*Buffer AE*). Após repouso de aproximadamente cinco minutos foi realizada uma centrifugação a 13200 g, durante dois minutos. Posteriormente as amostras foram guardadas a $-80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até serem amplificadas.

O protocolo de extracção de DNA pode ser representado da seguinte forma:



Figura 10 - Representação esquemática da extracção de DNA (Adaptado do protocolo de extracção de DNA – QIAamp® DNA Mini Kit - Qiagen).

Com o objectivo de avaliar e controlar o rendimento das extracções, foi realizada a quantificação de DNA nas amostras respiratórias recolhidas e do controlo, através de espectrofotómetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific), a um comprimento de onda de 260 nm. Para a quantificação de cada amostra foi utilizado 1 µL de DNA e verificada a sua concentração e pureza, caracterizada pela razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm.

2.3.2 Amplificação do locus *mtLSU rRNA* pela *nested-PCR*

A detecção molecular de *P. jirovecii* nas amostras respiratórias foi efectuada através da amplificação de um fragmento (263 pb) do gene mitocondrial multicópia *mtLSU rRNA* por *nested-PCR*. Na *nested-PCR* foram utilizados os pares de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) externos, pAZ 102-E e pAZ 102-H, especificamente para a primeira parte de amplificação; e internos, pAZ 102-X e pAZ 102-Y, para a segunda parte de amplificação (Wakefield *et al.* 1990b; Tamburrini *et al.* 1996; Wakefield 1996; Matos *et al.* 1999, 2001). Os *primers* utilizados nas duas fases do protocolo são os enunciados no **Quadro 4**, e foram descritos pela primeira vez por Wakefield *et al.* em 1990 e Tamburrini *et al.* em 1996.

Quadro 4. Características dos *primers* utilizados na *nested-PCR* para amplificação do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*.

Locus	PCR	<i>primers</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	Produto (pb)
<i>mtLSU rRNA</i>	1ª parte	pAZ 102-E	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	20	346
	<i>primer exterior</i>	pAZ 102-H	GTGTACGTTGCAAAGTACTC	20	
	2ª parte	pAZ 102-X	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	22	263
	<i>primer interior</i>	pAZ 102-Y	TCACTTAATATTAATTGGGGAGC	23	

Para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 20 µl, contendo 1X tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCL [pH 8.8], 0,01% Tween-20, Bioline); 0,2 mM de cada desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs, do inglês *deoxyribonucleotide triphosphates*) (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada *primer* externo pAZ 102-E e pAZ 102-H (MWG Biotech), 2,5 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,01 µg/µL de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) (Fermentas), 0,75 U de BioTaqTM DNA polimerase (Bioline), 2 µL da amostra de DNA genómico extraído, perfazendo o volume final de 20 µL com água desionizada estéril. Na segunda

PCR, 2 µL de produto da reacção da primeira PCR foi adicionado como molde para a segunda parte. Esta segunda amplificação foi preparada nas mesmas condições e concentrações referidas anteriormente, diferindo apenas no conjunto de *primers* internos utilizados, 0,2 µM de cada pAZ 102-X e pAZ 102-Y (MWG Biotech).

De modo a verificar a qualidade das condições de amplificação da técnica, foram utilizados durante todo o procedimento dois controlos positivos (suspensão de DNA genómico de *P. jirovecii* previamente caracterizada como sendo positiva para o microrganismo), e dois controlos negativos compostos por todos os componentes da mistura de reacção e por água desionizada estéril em substituição do DNA molde, como indicador da inexistência de contaminação por DNA exógeno.

As reacções de amplificação foram realizadas num termociclador *T1 Thermocycler* (Biometra®), segundo as condições térmicas descritas no **Quadro 5**.

Quadro 5. Condições térmicas aplicadas nas duas etapas da *nested*-PCR para amplificação do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*.

Etapas PCR	Condições de amplificação	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C – 3 min	39
Desnaturação	94°C – 1 min	
Ligação	55°C – 1 min	
Extensão	72°C – 1 min	
Extensão final	72°C – 10 min	

O DNA amplificado por PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose. A 10 µL de produto de reacção da segunda etapa de amplificação adicionou-se 1 µL de tampão de aplicação (Fermentas). A análise do tamanho molecular de cada fragmento de DNA observado foi realizada através da comparação com uma amostra de marcador de pesos moleculares de 100 pb (Gene Ruler™ – Fermentas). Assim, da mesma forma, a 1 µL de marcador molecular, adicionou-se 1 µL de tampão de aplicação e 9 µL de água desionizada estéril. Numa tina de eletroforese com tampão TAE 1X, colocou-se um gel de agarose a 1,5% (m/v) (Merk), em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM

EDTA [pH 8.3]) (Sigma-Aldrich) e ao qual, foi incorporado brometo de etídio (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 0,5 µg/mL. As amostras de DNA foram aplicadas nos respectivos poços e submetidas a uma corrente eléctrica de 100 volts (V), durante aproximadamente 60 minutos. A visualização dos fragmentos de DNA amplificados foi obtida sob uma luz ultravioleta (UV), por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado no DNA, num transiluminador (Vilber Lourmat).

A **Figura 11** representa os resultados obtidos, por electroforese em gel de agarose da amplificação do gene *mtLSU rRNA* por *nested-PCR*.

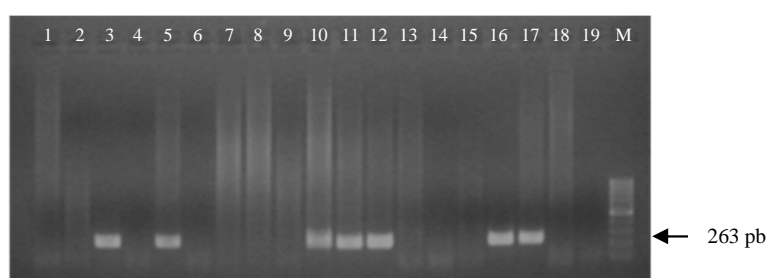


Figura 11 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação pela *nested-PCR* de um fragmento de 263 pb do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii*. Poço 1-15: Amostras biológicas em estudo; Poço 16 e 17: Controlos positivos; Poço 18 e 19: Controlos negativos; Poço 11: Marcador de pesos moleculares de 100 pb (Gene Ruler™ – Fermentas).

2.3.3 Amplificação do locus *KEX1* por RT-qPCR

Para além da técnica de *nested-PCR*, às mesmas amostras biológicas aplicou-se uma outra técnica de biologia molecular, a RT-qPCR. Esta técnica foi utilizada para amplificar e simultaneamente quantificar o produto absoluto de amplificação de DNA de *P. jirovecii*, tendo especificamente como alvo o gene nuclear de cópia única que codifica a protease serina *Kexin* (*KEX1*), descrita como exclusiva deste microrganismo (Kutty & Kovacs 2003; Esteves *et al.* 2009, 2012; Rohner *et al.* 2009).

O procedimento foi realizado de acordo com os protocolos comerciais do fabricante (Applied Biosystems). Assim sendo, para cada amostra, a composição da mistura de reacção para um volume final de 20 µL, consistiu na utilização de 9 µL de DNA da amostra biológica, 1X mistura de reacção (TaqMan® Gene Expression Master Mix), que contém a enzima de polimerização (AmpliTaQ Gold), o respectivo tampão de reacção, Uracilo-DNA Glicosidase (UDG), dNTPs incluindo desoxiuridina trifosfato (dUTP) e

ROX como fluorescência passiva, que fornece uma referência interna, permitindo a normalização do sinal do *repórter*, 1X solução de ensaio (Assay Mix), que contém os respectivos *primers* e a sonda TaqMan[®] MGB (do inglês, *minor-groove binder probe*) com marcação FAM[™]. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas no **Quadro 6** (Rohner *et al.* 2009).

Quadro 6. Características dos *primers* utilizados na RT-qPCR para amplificação do gene *KEX1* de *P. jirovecii*.

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	Marcação
<i>Forward</i>	CAACCCTGTTCCAATGCCTAA	21	-
<i>Reverse</i>	CAACACCGATTCCACAAACAGT	22	-
<i>Probe</i>	TGCTGGTGAAGTAGCTGCCGTTCTGA	25	FAM

A utilização de sistemas de sondas fluorescentes na RT-qPCR permite uma detecção sensível e específica, uma vez que, em condições de reacção óptimas só é reconhecido o produto de PCR desejado. As sondas TaqMan[®] ou sondas de hidrólise são específicas da sequência molde e transportam um marcador fluorescente na extremidade 5' (*repórter*) e uma molécula não fluorescente na extremidade 3' (*quencher*). Durante a fase de hibridação, dá-se a ligação por complementaridade com o segmento de DNA alvo a amplificar, na presença dos *primers*. A proximidade do *repórter* e do *quencher* não permite que a fluorescência do primeiro aconteça (**Figura 12.A**). Na fase de extensão da cadeia de DNA, a DNA polimerase faz a extensão do *primer* e, quando se aproxima da sonda, exerce a sua actividade exonucleolítica 5'→3', libertando o *repórter* da sonda. Assim, é emitida fluorescência proporcional à quantidade de produto amplificado, a qual poderá depois ser quantificada (**Figura 12.B**) (Qiagen 2004-2006; Mackay 2004).

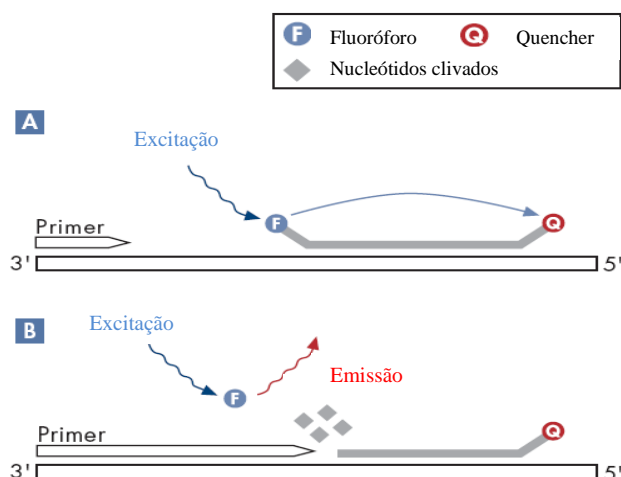


Figura 12 – Princípio de funcionamento das sondas *TaqMan*[®] (Adaptado de QIAGEN, 2004-2006. *Critical Factors for Successful Real-Time PCR*).

No decorrer da técnica, foram utilizados dois controlos positivos (suspensão de DNA genómico de *P. jirovecii* previamente caracterizada como sendo positiva para o microrganismo), com diluições seriadas e dois controlos negativos constituídos por todos os componentes da mistura de reacção e por água desionizada estéril em substituição do DNA molde.

Todas as reacções de RT-qPCR foram realizadas no termociclador da *Applied Biosystems*, modelo 7500 *real-time PCR system* (**Figura 13**), em microplacas de 96 poços (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany).

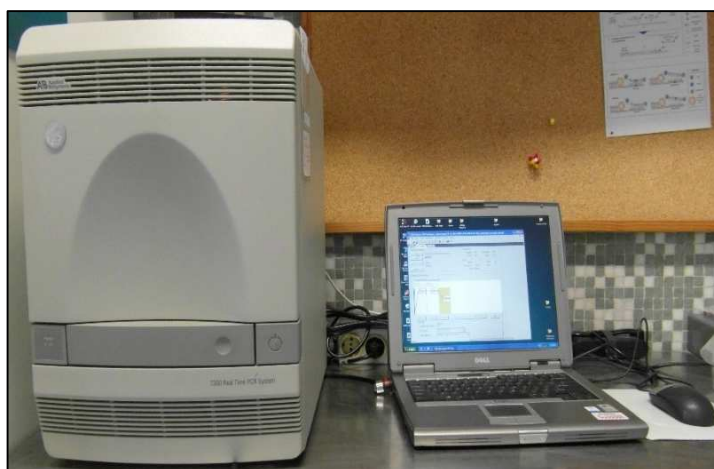


Figura 13 – Imagem do termociclador da *Applied Biosystems*, modelo 7500 *real-time PCR system* (fotografia da autora).

Os detalhes das condições térmicas aplicadas na técnica de RT-qPCR, para detecção e quantificação do gene *KEX1* de *P. jirovecii*, encontram-se descritos na **Figura 14**.

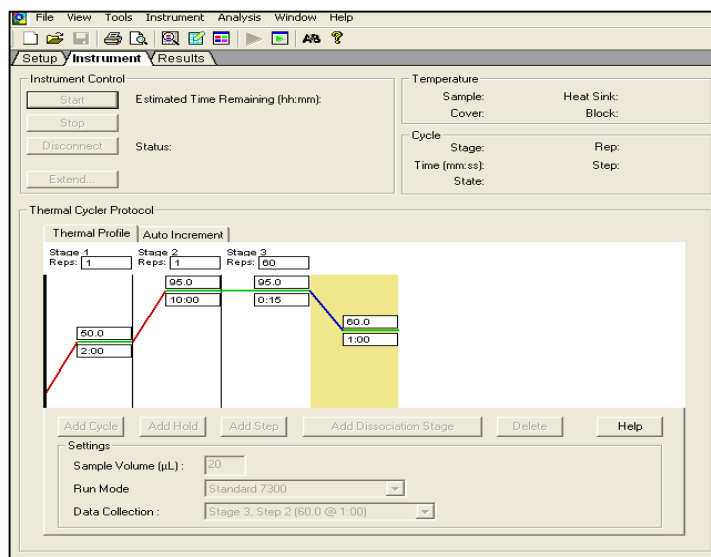


Figura 14 – Imagem do programa do termociclador da *Applied Biosystems*, com as condições térmicas aplicadas na técnica RT-qPCR.

O **Quadro 7** traduz as condições de amplificação e os ciclos da técnica de RT-qPCR. A primeira etapa (dois minutos a 50°C), é fundamental para uma actividade óptima da UDG. Esta enzima permite um tratamento preventivo das sequências, ao impedir, através da hidrólise do uracilo incorporado quer nas sequências de DNA em cadeia dupla, quer nas sequências de DNA em cadeia simples, a amplificação de subprodutos que contenham uracilo. A conjugação da UDG e o dUTP como constituintes da mistura de reacção da RT-qPCR é amplamente utilizada para evitar o aumento de sequências resultantes de reacções inespecíficas, impedindo assim a sua amplificação e a consequente obtenção de falsos positivos. As cadeias nucleotídicas com uracilo são clivadas, tornando-se inexequível a sua amplificação pela polimerase, impedindo, desta forma, a propagação de eventuais contaminações, e permitindo, apenas, a amplificação de sequências alvo genuínas. A segunda etapa de 10 minutos a 95°C, para além de garantir a desnaturação da cadeia dupla de DNA, permite a inactivação da UDG e a activação da AmpliTaq Gold, uma enzima de polimerização modificada quimicamente

para actuar, apenas, após ser submetida às condições descritas na etapa inicial. Seguindo-se a etapa de desnaturação, ligação e extensão com 60 ciclos (Esteves 2010).

Quadro 7 - Condições térmicas e ciclos aplicados na técnica RT-qPCR.

Etapas PCR	Condições de amplificação	Nº de ciclos
Activação da UDG	50°C – 2 min	
Activação da DNA polimerase	95°C – 10 min	
Desnaturação inicial		
Desnaturação	95°C – 15 seg	60
Ligação		
Extensão	60°C – 1 min	

Nos ciclos de amplificação mais precoces, tipicamente entre três e 15, verifica-se uma fluorescência basal (*baseline*), que corresponde a uma fase da reacção em que ainda não é possível detectar o verdadeiro aumento de fluorescência. O limiar de fluorescência (*threshold*) foi definido a 0.02, superior ao nível de fluorescência atribuído ao ruído de fundo e significativamente menor que o *plateau* da curva de amplificação (Esteves *et al.* 2012). O número do ciclo no qual a curva de amplificação atravessa o limiar de fluorescência é designado de *cycle threshold* (C_T) e representa o ponto a partir do qual o aumento de fluorescência passa a ser detectável. Este valor é depois considerado para quantificação da amostra, em que, quanto maior o C_T , menor a quantidade de ácido nucleico e vice-versa (Qiagen 2004-2006; Hauser *et al.* 2011) (**Figura 15**). As amostras do estudo foram consideradas positivas apenas se o resultado excedesse o *threshold* e apresentasse curvas com um padrão de amplificação exponencial (Alvarez-Martínez *et al.* 2006; McTaggart *et al.* 2012).

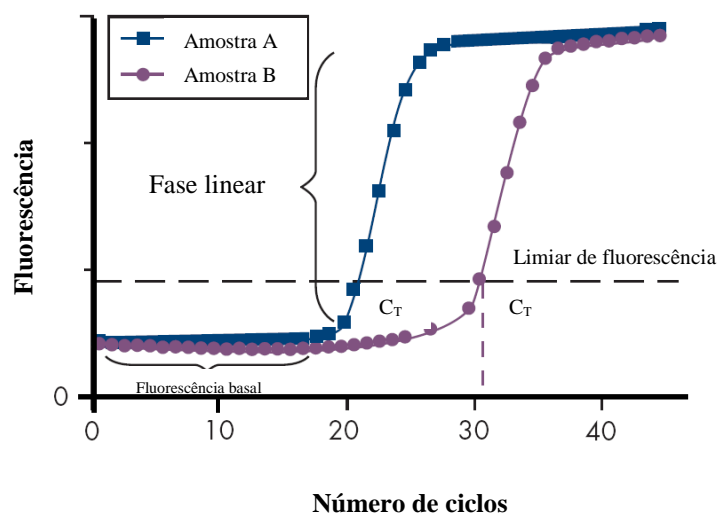


Figura 15 – Curvas de amplificação de duas amostras com quantidades diferentes de DNA (Adaptado de QIAGEN, 2004-2006. *Critical Factors for Successful Real-Time PCR*).

2.3.4 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada pelo programa informático SPSS® (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*) versão 18.0 (IBM), através do teste de hipótese não-paramétrico Qui-quadrado (χ^2), recorrendo ao teste exacto de *Fisher* quando necessário, utilizado para verificar associações entre variáveis qualitativas dicotómicas, com um nível de significância inferior a 0.05.

Os resultados obtidos por RT-qPCR foram expressos em valores de C_T , correspondendo este valor ao ciclo a partir do qual a reacção de PCR entra na fase exponencial.

RESULTADOS

3.1 Características demográficas e clínicas da população em estudo

No presente estudo, 300 amostras biológicas respiratórias das quais, 228 SB, 65 LBA, quatro EB e três EE, recolhidas no período de um ano (2012–2013) no Serviço de Anatomia Patológica do HEM-CHLO, foram submetidas à detecção de *P. jirovecii* por técnicas moleculares. As 300 amostras seleccionadas para estudo, foram obtidas de 300 doentes imunocomprometidos, com sintomatologia respiratória.

A distribuição em grupos e subgrupos de condições clínicas foi analisada tendo em conta outros trabalhos (Matos *et al.* 2003, 2006; Gupta *et al.* 2009; Jiancheng *et al.* 2009; Wilson *et al.* 2011; Muhlethaler *et al.* 2012; Kim *et al.* 2014; Roux *et al.* 2014).

Num universo de 300 indivíduos, 274 correspondem a doentes seronegativos para VIH com uma patologia subjacente: neoplasia, DPOC, pneumonia que não PPc, tuberculose, doença autoimune, transplantado de órgão e outras causas (diabetes mellitus e fibrose pulmonar), todos assintomáticos para PPc; e 26 amostras de doentes seropositivos para VIH, sintomáticos para PPc, ou com outra causa clínica (neoplasia, insuficiência respiratória, tuberculose e DPOC).

O desenho deste projecto no que respeita à população em estudo, foi realizado de modo a, relativamente aos doentes seronegativos para VIH, corresponder: um doente, uma amostra respiratória e uma condição clínica de inclusão nos grupos constituídos. Já quanto aos doentes seropositivos para VIH: um doente, uma amostra respiratória e um diagnóstico clínico de suspeita de PPc, ou outra condição clínica subjacente.

Verificou-se que 68% (204/300) dos doentes era do género masculino e 32% (96/300) do género feminino, com idades compreendidas entre os 19 e os 98 anos. A média das idades foi de 62 anos e a mediana de 64 anos.

No **Quadro 8** estão representados os grupos etários dos doentes, de acordo com o género e quanto à infecção por VIH.

Quadro 8. Distribuição das idades dos doentes por grupos etários, de acordo com o género e quanto à infecção por VIH.

Grupo etário	Género		Número (%) de doentes		
	Masculino	Feminino	Seronegativo para VIH	Seropositivo para VIH	Total
15 – 24	0	2	1 (0)	1 (0)	2 (1)
25 – 34	8	10	13 (4)	5 (2)	18 (6)
35 - 44	17	7	16 (5)	8 (3)	24 (8)
45 - 54	28	21	42 (14)	7 (2)	49 (16)
55 - 64	42	17	56 (19)	3 (1)	59 (20)
≥ 65	109	39	146 (49)	2 (1)	148 (49)
TOTAL	204	96	274 (91)	26 (9)	300 (100)

Toda a população em estudo é constituída por indivíduos adultos, em que 1% pertence ao grupo etário entre os 15 e os 24 anos; 6% entre os 25 e os 34 anos; 8% entre 35 e os 44 anos; 16% entre os 45 e os 54 anos; 20% entre os 55 e os 64 anos e 49% dos doentes com idade igual ou superior a 65 anos. Da análise do gráfico da **Figura 16** é possível constatar que, a maioria dos doentes se situa na faixa etária acima dos 64 anos.

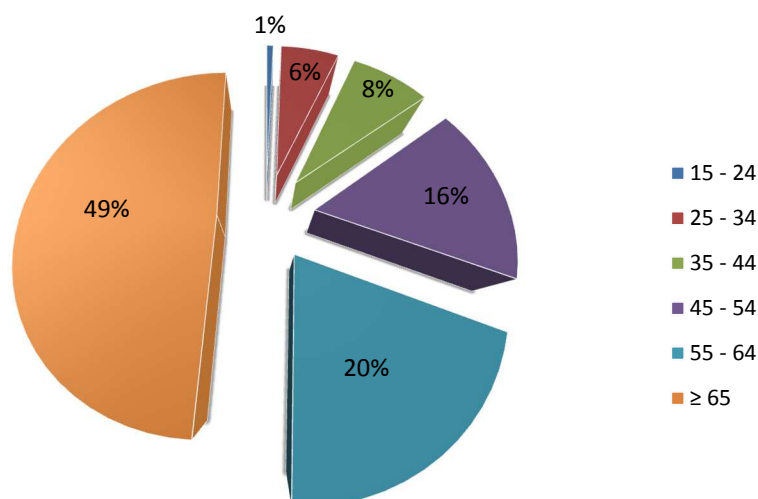


Figura 16. Distribuição das idades dos doentes estudados pelos grupos etários definidos.

Estes indivíduos representam duas categorias de imunocomprometidos com factores de risco para infecção por *P. jirovecii*, uma constituída por doentes seronegativos para VIH (274/300; 91%) e outra por doentes seropositivos para VIH (26/300; 9%).

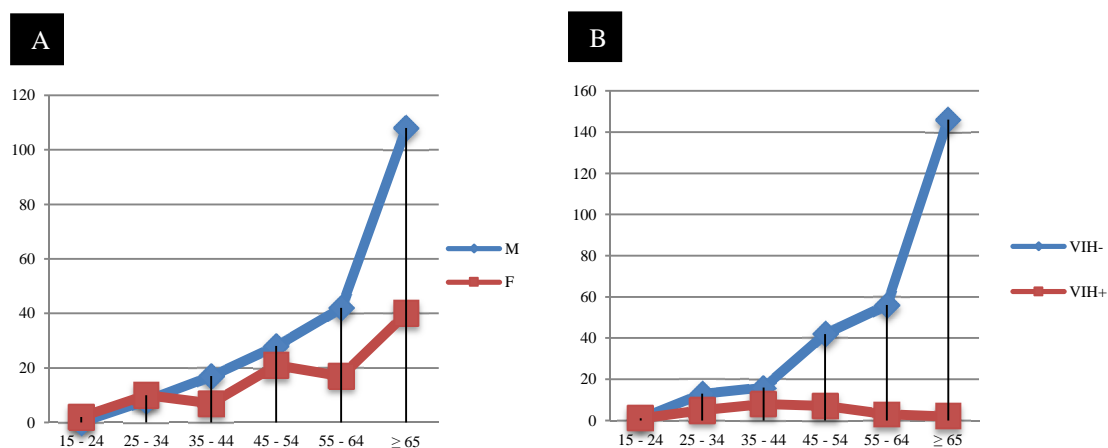


Figura 17. Distribuição do número de doentes pelos grupos etários: A - quanto ao género e B - quanto à infecção pelo VIH.

De acordo com os gráficos da **Figura 17**, a distribuição dos doentes pelos diversos grupos etários quanto ao género (**Figura 17.A**), segue a mesma acentuada tendência ascendente a partir dos 64 anos, em ambos os sexos, com algumas oscilações decrescentes no género feminino, na faixa etária entre os 35 e os 44 anos e a faixa etária entre os 55 e os 64 anos. Já relativamente à condição de infecção por VIH (**Figura 17.B**), o maior número de seropositivos situa-se nos grupos etários entre os 35 e os 44 anos e os 45 e os 54 anos. Nos doentes seronegativos, verificou-se uma propensão sempre ascendente ao longo dos diversos grupos etários, com maior expressão a partir dos 64 anos.

Através do levantamento do diagnóstico clínico, foi possível constituir sete grupos e dois subgrupos de condições clínicas de doentes seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência; e um grupo e dois subgrupos de condições clínicas de doentes seropositivos para VIH. O **Quadro 9** sumariza a condição clínica dos doentes que foi tida em conta neste estudo e o tipo de amostras biológicas respiratórias obtidas.

Quadro 9. Distribuição dos doentes em grupos e subgrupos pela condição clínica e pelo tipo de amostra biológica recolhida.

Condição clínica ^a	Número (%) de doentes	Número (%) de amostras biológicas ^b			
		SB	LBA	EB	EE
Doentes seronegativos para VIH	274 (91,3)	204 (68)	63 (21)	4 (1,3)	3 (1)
Neoplasia	139 (46,3)	121 (40,3)	14 (4,7)	4 (1,3)	0
Hematológica	8 (2,7)	3 (1)	4 (1,3)	1 (0,3)	0
Sólida	131 (43,7)	119 (39,7)	9 (3)	3 (1)	0
DPOC	45 (15)	30 (10)	13 (4,3)	0	2 (0,7)
Pneumonia (não PPc)	37 (12,7)	26 (8,7)	10 (3,3)	0	1 (0,3)
Tuberculose	17 (5,7)	12 (4)	5 (1,7)	0	0
Doença autoimune	16 (5,3)	4 (1,3)	12 (4)	0	0
Transplantado de órgão	9 (3)	5 (1,7)	4 (1,3)	0	0
Outras causas	11 (3,7)	6 (2)	5 (1,7)	0	0
Doentes seropositivos para VIH	26 (8,7)	24 (8)	2 (0,7)	0	0
Suspeita de PPc	10 (3,3)	10 (3,3)	0	0	0
Outras causas	16 (5,3)	14 (4,7)	2 (0,7)	0	0
TOTAL	300 (100)	228 (76)	65 (21,7)	4 (1,3)	3 (1)

^a VIH, vírus da imunodeficiência humana; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crónica; PPc, pneumonia por *Pneumocystis*; Doentes seronegativos para VIH com outras causas, diabetes mellitus e fibrose pulmonar; Doentes seropositivos para VIH com outras causas, neoplasia, insuficiência respiratória, tuberculose e DPOC.

^b SB, secreção brônquica; LBA, lavado broncoalveolar; EB, escovado brônquico; EE, expectoração espontânea.

O diagnóstico clínico predominante nos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, com diferentes graus de imunodeficiência é de neoplasia (139/300; 46,3%), no qual apenas 2,7% (8/300) representam neoplasias hematológicas e 43,7% (131/300) neoplasias sólidas. As secreções brônquicas constituem 40,3% (121/300) das amostras biológicas recolhidas neste tipo de patologia; 4,7% (14/300) LBA; e somente 1,3% (4/300) EB. Cerca de 15% (45/300) apresentam diagnóstico clínico de DPOC, em que 10% (30/300) representam amostras de SB; 4,3% (13/300) LBA; e 0,7% (2/300) EE. As pneumonias que não PPc, constituem 12,7% (37/300) da totalidade dos doentes em estudo, em que 8,7% (26/300) correspondem a SB; 3,3% (10/300) LBA; e 0,3% (1/300) EE. A tuberculose e a doença autoimune representam 5,7% (17/300) e 5,3% (16/300) dos casos, respectivamente; dos quais 4% (12/300) e 1,3% (4/300) correspondem a amostras de SB, e 1,7% (5/300) e 4% (12/300) LBA, respectivamente. Os doentes submetidos a transplante de órgão, compõem 3% (9/300) das patologias; no que se

refere ao tipo de espécimes biológicos obtidos neste grupo, encontram-se 1,7% (5/300) amostras de SB e 1,3% (4/300) amostras de LBA. Apenas 3,7% (11/300) dos indivíduos seronegativos para VIH do estudo se insere na condição clínica de outras causas (diabetes mellitus e fibrose pulmonar), em que as SB constituem 2% (6/300) e os LBA 1,7% (5/300) das amostras biológicas.

Quanto aos doentes seropositivos para VIH, através da recolha dos dados clínicos foi possível estabelecer dois subgrupos, um (10/300; 3,3%) com suspeita clínica de PPc e outro (16/300; 5,3%) com outras causas (neoplasia, insuficiência respiratória, tuberculose e DPOC). As SB constituem 8% (24/300) e os LBA 0,7% (2/300) do tipo de amostras respiratórias obtidas neste grupo. O gráfico da **Figura 18** representa a distribuição do número de doentes pelos grupos de condições clínicas constituídas e pelo tipo de amostra biológica estudada.

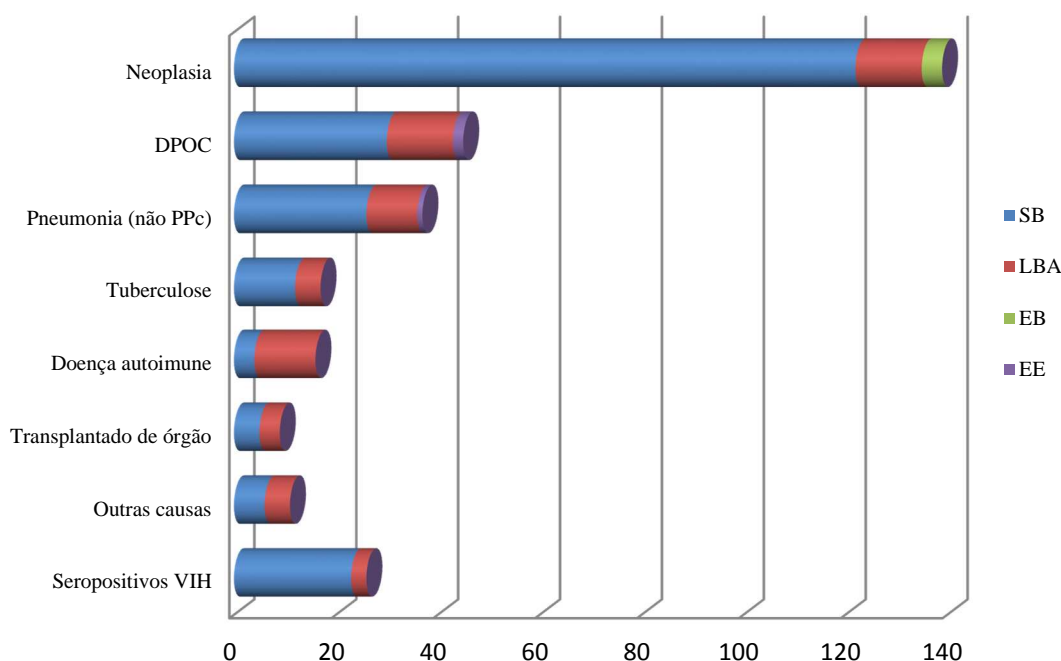


Figura 18. Distribuição do número de doentes por condição clínica e pelo tipo de amostra biológica.

No total, as SB representam 76% (228/300), a maior percentagem do tipo de amostra biológica respiratória analisada no presente estudo, seguida dos LBA (65/300; 21,7%), EB (4/300; 1,3%) e EE (3/300; 1%).

3.2 Diagnóstico molecular

As amostras respiratórias ($n = 300$), foram testadas por duas técnicas de PCR, a *nested*-PCR para a detecção de DNA genómico através da amplificação de um fragmento específico do gene *mtLSU rRNA* de *P. jirovecii* e outra, a RT-qPCR, para a detecção e quantificação de DNA de *P. jirovecii*, tendo como alvo o gene nuclear *KEX1*, após extracção de DNA.

Dos 300 espécimes biológicos, verificou-se que 39,7% (119/300) das amostras foram positivas para infecção por *P. jirovecii*, enquanto que as restantes (181/300; 60,3%) foram negativas. Para efeitos de análise da distribuição de resultados, foram estudadas diversas associações, entre as quais, quanto ao número de resultados positivos e negativos de infecção por *P. jirovecii* obtidos em cada um dos géneros e segundo os diferentes tipos de amostras biológicas (**Quadro 10**).

Quadro 10. Distribuição dos resultados quanto à presença de infecção por *P. jirovecii*, por género e tipo de amostra biológica.

Características ^a	Número (%) de doentes com infecção por <i>P. jirovecii</i>	
	Positivo	Negativo
Masculino ($n = 204$)	79 (38,7)	125 (61,3)
Feminino ($n = 96$)	40 (41,7)	56 (58,3)
SB ($n = 228$)	102 (44,7)	126 (55,3)
LBA ($n = 65$)	16 (24,6)	49 (75,4)
EB ($n = 4$)	1 (25)	3 (75)
EE ($n = 3$)	0 (0)	3 (100)
TOTAL	119 (39,7)	181 (60,3)

^a SB, secreção brônquica; LBA, lavado broncoalveolar; EB, escovado brônquico; EE, expectoração espontânea.

No que se refere ao género, verificou-se no sexo feminino (40/96; 41,7%) uma frequência discretamente mais elevada de casos positivos, comparativamente ao sexo masculino (79/204; 38,7%). Relativamente ao tipo de amostra biológica respiratória, registaram-se 44,7% (102/228) resultados positivos e 55,3% (126/228) resultados negativos em amostras de SB; 24,6% (16/65) casos positivos e 75,4% (49/65) casos negativos em amostras do líquido do LBA; e apenas 25% (1/4) de EB teve resultado positivo e todas as restantes amostras (3/4; 75% EB e 3/3; 100% EE) de EB e EE foram

negativas para infecção por *P. jirovecii*. Alguns dos resultados sugerem a importância da SB na detecção de infecção pelo microrganismo. Estatisticamente, obteve-se uma associação significativa entre as SB e a presença de DNA de *P. jirovecii*, com um nível de significância de $P = 0.001$.

Quanto à distribuição dos resultados pelos diferentes grupos etários registaram-se, na faixa etária entre os 15 e os 24 anos, 50% (1/2) das amostras foram positivas e 50% (1/2) negativas; e entre os 25 e os 34 anos, 28% (5/18) espécimes biológicos foram positivos e 72% (13/18) negativos. No intervalo compreendido entre os 35 e os 44 anos, e entre os 45 e os 54 anos verificaram-se, 54% (13/24) e 53% (26/49) resultados positivos e 46% (11/24) e 47% (23/49) resultados negativos respectivamente, tais frequências correlacionadas com um maior número de doentes seropositivos para VIH nestes dois grupos etários, como mencionado na secção “3.1 Características demográficas e clínicas da população em estudo”. No grupo etário entre os 55 e os 64 anos, 41% (24/59) representaram amostras positivas e 59% (35/59) amostras negativas; já nos doentes com idade igual ou superior a 65 anos, 34% (50/148) foram positivas para infecção por *P. jirovecii* e 66% (98/148) foram negativas (**Figura 19**).

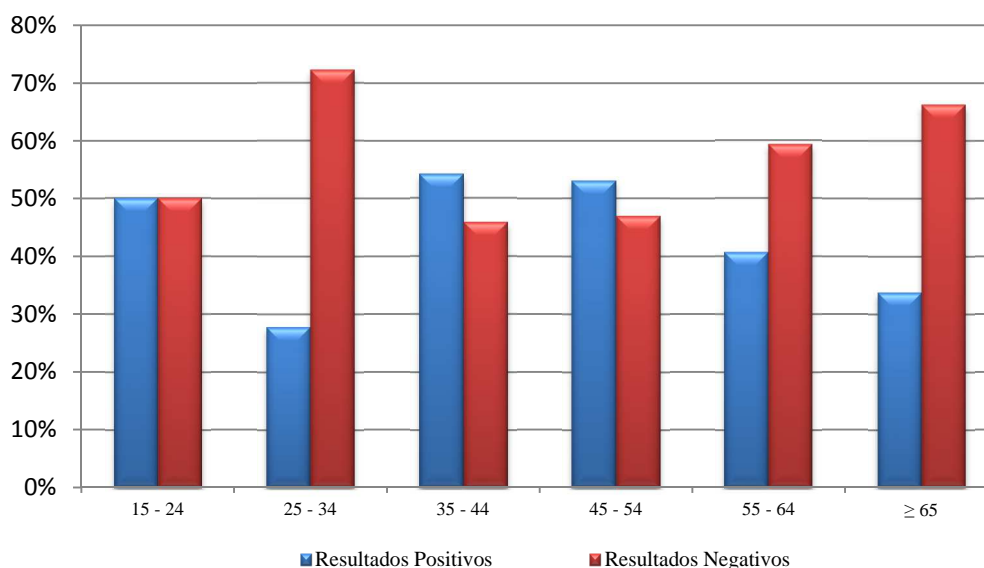


Figura 19. Distribuição dos resultados obtidos quanto à presença de infecção por *P. jirovecii* nos diferentes grupos etários.

O **Quadro 11** sistematiza os resultados obtidos quanto à infecção por *P. jirovecii*, de acordo com os diversos grupos e subgrupos definidos de condição clínica de cada doente.

Quadro 11. Associação entre condição clínica dos doentes e a presença de infecção por *P. jirovecii*.

Condição clínica ^a	Número (%) de doentes com infecção por <i>P. jirovecii</i>		Valor de <i>P</i>
	Positiva	Negativa	
Doentes seronegativos para VIH (<i>n</i> = 274)	98 (35,8)	176 (64,2)	<0.001*
Neoplasia (<i>n</i> = 139)	51 (36,7)	88 (63,3)	0.328
Hematológica (<i>n</i> = 8)	2 (25)	6 (75)	0.390
Sólida (<i>n</i> = 131)	49 (37,4)	82 (62,6)	0.481
DPOC (<i>n</i> = 45)	20 (44,4)	25 (55,6)	0.477
Pneumonia (não PPc) (<i>n</i> = 37)	9 (24,3)	28 (75,7)	0.242
Tuberculose (<i>n</i> = 17)	1 (5,9)	16 (94,1)	0.003*
Doença autoimune (<i>n</i> = 16)	5 (31,2)	11 (68,8)	0.479
Transplantado de órgão (<i>n</i> = 9)	8 (88,9)	1 (11,1)	0.003*
Outras causas (<i>n</i> = 11)	4 (36,4)	7 (63,6)	0.820
Doentes seropositivos para VIH (<i>n</i> = 26)	21 (80,8)	5 (19,2)	<0.001*
Suspeita de PPc (<i>n</i> = 10)	10 (100)	0	<0.001*
Outras causas (<i>n</i> = 16)	11 (68,8)	5 (31,2)	0.015*
TOTAL	119 (39,7)	181 (60,3)	

^a VIH, vírus da imunodeficiência humana; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crónica; PPc, pneumonia por *Pneumocystis*; Doentes seronegativos para VIH com outras causas, diabetes mellitus e fibrose pulmonar; Doentes seropositivos para VIH com outras causas, neoplasia, insuficiência respiratória, tuberculose e DPOC.

* Valor de *P* <0.05

Tendo em conta a informação disponibilizada no **Quadro 11**, verificou-se que, da análise realizada às 300 amostras biológicas, DNA de *P. jirovecii* foi detectado em todas as condições clínicas dos doentes em estudo. Tendo sido obtido no total 39,7% (119/300) de resultados positivos, dos quais 35,8% (98/274) em doentes seronegativos para VIH e 80,8% (21/26) em seropositivos para VIH.

Entre os doentes seronegativos para VIH com diferentes graus de imunodeficiência, DNA do microrganismo foi detectado em 36,7% (51/139) dos casos de patologia neoplásica, constituindo 25% (2/8) neoplasia hematológica e 37,4% (49/131) neoplasia

sólida. Já 44,4% (20/45) representam DPOC; 24,3% (9/37) a pneumonia que não PPc; 5,9% (1/17) a tuberculose; e 31,2% (5/16) num contexto de doença autoimune. O transplante de órgão constitui 88,9% (8/9), em que a totalidade (7/7; 100%) dos indivíduos sujeitos a transplante renal foi positiva para o agente patogénico e em 50% (2/2) dos casos de transplante cardíaco. A condição clínica de outras causas representam 36,4% (4/11), das quais, em 50% (4/8) dos doentes com diabetes mellitus foi detectado DNA do microrganismo e todas (0/3; 0%) as amostras de doentes com fibrose pulmonar revelaram-se negativas. No total, os resultados negativos para infecção por *P. jirovecii* nesta categoria contabilizam 64,2% (176/274). Considerando os dados obtidos, foi possível constatar uma associação estatisticamente significativa, entre os doentes submetidos a transplante de órgão e a presença de DNA de *P. jirovecii* ($P = 0.003$). Ao invés, os doentes com diagnóstico de tuberculose, quando comparado com os restantes grupos de doentes, parecem apresentar menor probabilidade de co-infecção por *P. jirovecii* ($P = 0.003$).

Nos doentes imunocomprometidos seropositivos para VIH, 80,8% (21/26) foram positivos para infecção por *P. jirovecii* e os restantes (5/26; 19,2%) foram negativos. Destes, a totalidade (10; 100%; $P < 0.001$) das amostras foi positiva para o agente patogénico quando na presença de suspeita clínica de PPc e em 68,8% (11/16; $P = 0.015$) dos casos quando simultaneamente associado a outra causa: em 50% (3/6) dos doentes com neoplasia, a totalidade (5/5; 100%) dos doentes com insuficiência respiratória, 50% (2/4) dos doentes com tuberculose e em 100% (1/1) dos doentes com DPOC. Também nos indivíduos seropositivos para VIH foi possível observar uma associação estatística significativa, entre esta condição clínica e a presença de DNA de *P. jirovecii*, com um nível de significância de $P < 0.001$. Relação inversa, constatou-se, relativamente aos doentes seronegativos para VIH ($P < 0.001$), que parecem apresentar uma menor probabilidade de infecção pelo parasita, comparativamente aos seropositivos para VIH.

Face a estes elementos, o **Quadro 12** espelha as divergências e concordâncias de resultados obtidos na detecção de *P. jirovecii*, da comparação entre a técnica de *nested*-PCR e a técnica de RT-qPCR.

Quadro 12. Comparação entre os resultados obtidos pelas técnicas de *nested*-PCR e de RT-qPCR.

Técnicas		<i>nested</i> -PCR		Total
		Positiva (%)	Negativa (%)	
RT-qPCR	Positiva (%)	44 (14,7)	11 (3,7)	55 (18,3)
	Negativa (%)	64 (21,3)	181 (60,3)	245 (81,6)
Total		108 (36)	192 (64)	300 (100)

Verificou-se que 14,7% (44/300) das amostras foram confirmadas como sendo positivas para infecção por *P. jirovecii*, através de ambas as técnicas moleculares, enquanto 3,7% (11/300) amostras apenas foram consideradas como sendo positivas para *P. jirovecii* pela técnica de RT-qPCR e 21,3% (64/300) amostras pela técnica de *nested*-PCR, as restantes (181/300; 60,3%) amostras biológicas foram negativas para infecção pelo microrganismo. No conjunto, a concordância de resultados observada por ambas as técnicas de PCR foi de 75% (225/300). Relativamente à sensibilidade e especificidade da técnica de RT-qPCR, e no que se relaciona à infecção por *P. jirovecii*, a *nested*-PCR foi considerada como o método de referência, tendo-se verificado uma especificidade de 94,3% e sensibilidade de 40,7%, o valor preditivo positivo foi de 80%, que avalia a probabilidade do indivíduo ter a doença quando o resultado é positivo e o valor preditivo negativo de 73,9%, que avalia a probabilidade de não existir doença quando o resultado é negativo.

O **Quadro 13** apresenta com maior detalhe a distribuição dos resultados obtidos por ambas as técnicas de PCR pela população em estudo, segundo o tipo de amostras biológicas analisadas e condições clínicas dos doentes.

Quadro 13. Distribuição dos resultados obtidos por ambas as técnicas de PCR pelo tipo de amostras biológicas analisadas e condições clínicas da população em estudo.

Características ^a	Técnicas de PCR			
	RT-qPCR		nested-PCR	
	Positiva (%)	Negativa (%)	Positiva (%)	Negativa (%)
SB (n = 228)	50 (21,9)	178 (78,1)	91 (39,9)	137 (60,1)
LBA (n = 65)	5 (7,7)	60 (92,3)	16 (24,6)	49 (75,4)
EB (n = 4)	0	4 (100)	1 (25)	3 (75)
EE (n = 3)	0	3 (100)	0	3 (100)
Doentes seronegativos para VIH (n = 274)	37 (13,5)	237 (86,5)	91 (33,2)	183 (66,8)
Neoplasia (n = 139)	16 (11,5)	123 (88,5)	47 (33,8)	92 (66,2)
Hematológica (n = 8)	0	8 (100)	2 (25)	6 (75)
Sólida (n = 131)	16 (12,2)	115 (87,8)	45 (34,4)	86 (65,6)
DPOC (n = 45)	4 (8,9)	41 (91,1)	20 (44,4)	25 (55,6)
Pneumonia (não PPc) (n = 37)	4 (10,8)	33 (89,2)	8 (21,6)	29 (78,4)
Tuberculose (n = 17)	0	17 (100)	1 (5,9)	16 (94,1)
Doença autoimune (n = 16)	4 (25)	12 (75)	5 (31,2)	11 (68,8)
Transplantado de órgão (n = 9)	6 (66,7)	3 (33,3)	8 (88,9)	1 (11,1)
Outras causas (n = 11)	3 (27,3)	8 (72,7)	2 (18,2)	9 (81,8)
Doentes seropositivos para VIH (n = 26)	18 (69,2)	8 (30,8)	17 (65,4)	9 (34,6)
Suspeita de PPc (n = 10)	8 (80)	2 (20)	10 (100)	0
Outras causas (n = 16)	10 (62,5)	6 (37,5)	7 (43,7)	9 (56,3)
TOTAL	55 (18,3)	245 (81,7)	108 (36)	192 (64)

^a SB, secreção brônquica; LBA, lavado broncoalveolar; EB, escovado brônquico; EE, expectoração espontânea; VIH, vírus da imunodeficiência humana; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; PPc, pneumonia por *Pneumocystis*; Doentes seronegativos para VIH com outras causas, diabetes mellitus e fibrose pulmonar; Doentes seropositivos para VIH com outras causas, neoplasia, insuficiência respiratória, tuberculose e DPOC.

No que respeita aos tipos de amostras biológicas estudadas, as SB revelaram uma menor frequência de infecção por *P. jirovecii* pela técnica de RT-qPCR (50/228; 21,9%), comparativamente à nested-PCR (91/228; 39,9%). Também os LBA apresentaram o mesmo alinhamento, com frequências de 7,7% (5/65) e 24,6% (16/65) para a RT-qPCR e nested-PCR respectivamente. Em relação aos EB e EE, apenas 25% (1/4) das amostras de EB foram positivas pela nested-PCR e todas as restantes (3, 75% EB; 3, 100% EE) negativas.

Do ponto de vista clínico e considerando a informação referente ao diagnóstico clínico, o gráfico da **Figura 20** expõe os resultados obtidos por ambas as técnicas moleculares utilizadas no projecto.

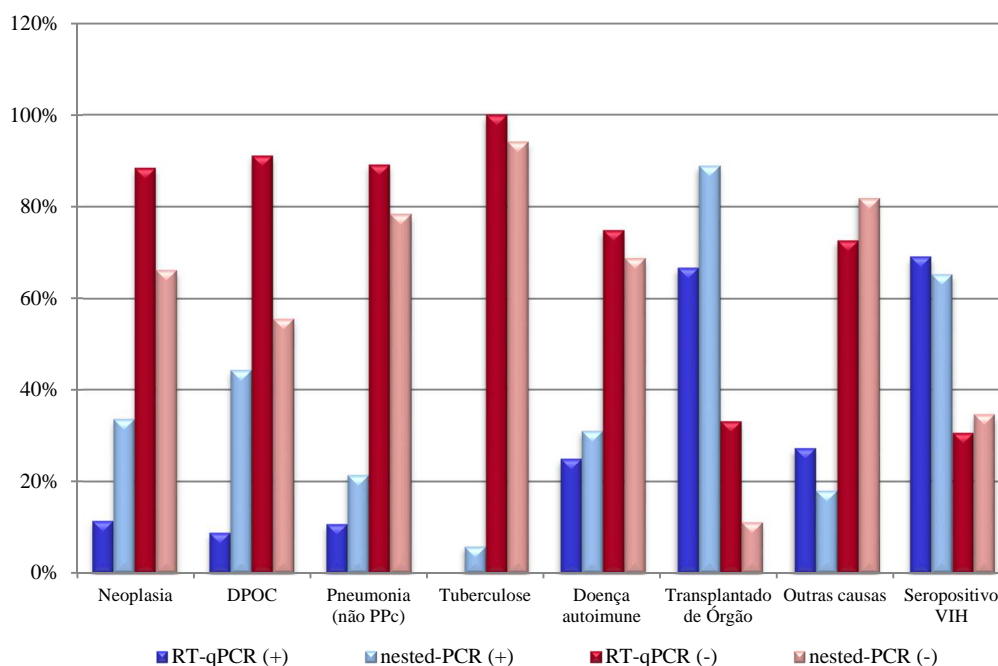


Figura 20. Comparação dos resultados obtidos pelas técnicas de RT-qPCR e de *nested*-PCR quanto às diversas condições clínicas dos doentes.

Da análise do **Quadro 13** e do gráfico da **Figura 20** verificou-se que, os doentes seronegativos para VIH com patologia neoplásica, DPOC e transplantado de órgão foram os que apresentaram os resultados com diferenças mais significativas entre ambas as técnicas moleculares, com distribuições de 11,5%, 8,9% e 66,7% de casos positivos pela técnica de RT-qPCR, e de 33,8%, 44,4% e 88,9% pela *nested*-PCR, respectivamente. Em relação à pneumonia que não PPc foi apurada uma frequência de 10,8% pela técnica de RT-qPCR e de 21,6% pela técnica de *nested*-PCR. Já no que respeita à condição clínica de tuberculose, não foi registado qualquer resultado positivo pelo método de RT-qPCR e apenas uma (1/17; 5,9%) amostra biológica foi positiva pela técnica de *nested*-PCR. Nos indivíduos com doença autoimune verificou-se a detecção do microrganismo em 25% e 31,2% pelas técnicas de RT-qPCR e *nested*-PCR respectivamente; e nos doentes com outras causas clínicas 27,3% resultados foram positivos pela técnica de RT-qPCR e 18,2% pela técnica de *nested*-PCR. Por último, os doentes seropositivos para VIH apresentaram frequências de infecção por *P. jirovecii* de 69,2% pela técnica de RT-qPCR e de 65,4% pela *nested*-PCR. Considerando os resultados positivos obtidos pelo método de RT-qPCR foi possível proceder à quantificação de cada uma das amostras, expressa em C_T (**Quadro 14**).

Quadro 14. Distribuição dos resultados positivos obtidos pela técnica de RT-qPCR, expressos em C_T , quanto ao tipo de amostra biológica e condição clínica de cada doente.

Amostra ^a	Diagnóstico ^b	C_T ^c	Amostra	Diagnóstico	C_T
SB	Neoplasia	33.99	LBA	Transplantado	22.5
SB	Neoplasia	35.17	SB	Transplantado	35.43
SB	Neoplasia	36.61	LBA	Transplantado	37.09
SB	Neoplasia	37.08	SB	Transplantado	38.25
SB	Neoplasia	38.78	SB	Transplantado	38.42
SB	Neoplasia	39.03	SB	Transplantado	41.5
SB	Neoplasia	42.6	SB	Outras causas (VIH-)	36.69
SB	Neoplasia	43.1	SB	Outras causas (VIH-)	44.46
SB	Neoplasia	43.3	SB	Outras causas (VIH-)	45.15
SB	Neoplasia	43.67	SB	Seropositivo VIH	22.83
SB	Neoplasia	45.88	SB	Seropositivo VIH	27.69
SB	Neoplasia	47.28	SB	Seropositivo VIH	29.67
SB	Neoplasia	48.96	SB	Seropositivo VIH	30.32
LBA	Neoplasia	49.67	SB	Seropositivo VIH	31.61
SB	Neoplasia	52.81	SB	Seropositivo VIH	34.44
SB	Neoplasia	57.01	SB	Seropositivo VIH	38.2
SB	DPOC	43.27	SB	Seropositivo VIH	38.37
SB	DPOC	45.36	LBA	Seropositivo VIH	38.55
SB	DPOC	49.17	SB	Seropositivo VIH	38.71
SB	DPOC	51.93	SB	Seropositivo VIH	39.26
SB	Pneumonia não PPc	34.44	SB	Seropositivo VIH	44.3
SB	Pneumonia não PPc	41.88	SB	Seropositivo VIH	45.25
SB	Pneumonia não PPc	50.02	SB	Seropositivo VIH	50.26
SB	Pneumonia não PPc	51.48	SB	Seropositivo VIH	51.25
SB	Doença autoimune	32.25	SB	Seropositivo VIH	51.4
LBA	Doença autoimune	40.59	SB	Seropositivo VIH	55.81
SB	Doença autoimune	44.73	SB	Seropositivo VIH	58.68
SB	Doença autoimune	54.12			

^a SB, secreção brônquica; LBA, lavado broncoalveolar; EB, escovado brônquico; EE, expectoração espontânea.

^b DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; PPc, pneumonia por *Pneumocystis*; VIH, vírus da imunodeficiência humana; Doentes seronegativos para VIH (VIH-) com outras causas, diabetes mellitus e fibrose pulmonar.

^c C_T , cycle threshold.

Tendo em conta, a inexistência na técnica de RT-qPCR de um C_T definido no caso de infecção por *P. jirovecii* (Brancart *et al.* 2005; Linssen *et al.* 2006; Mori *et al.* 2010; Botterel *et al.* 2012; McTaggart *et al.* 2012; Sanches *et al.* 2013), estando esta dependente dos alvos moleculares, da plataforma de PCR, dos métodos de detecção aplicados (Arcenas *et al.* 2006; Hauser *et al.* 2011), bem como da população em estudo, nomeadamente, da patologia de base dos doentes (Botterel *et al.* 2012); todos os valores absolutos obtidos foram considerados e utilizados para desenhar os gráficos, desde que excedessem o *threshold* e apresentassem curvas com um padrão de amplificação exponencial.

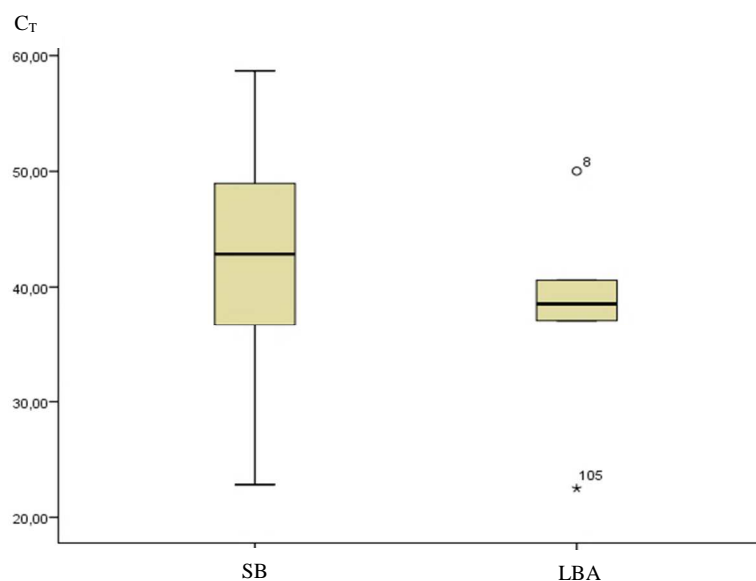


Figura 21. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C_T , quanto ao tipo de amostra respiratória.

O gráfico da **Figura 21** traduz a distribuição dos resultados positivos alcançados pelo método de RT-qPCR e traduzidos em C_T em função do tipo de amostra respiratória recolhida. No estudo da correlação entre as variáveis C_T e tipo de amostra biológica, das 50 (21,9%) amostras de SB positivas, verificou-se que a mediana obtida para os valores de C_T foi de 42.85, com um valor mínimo de 22.83 e um valor máximo de 58.68, enquanto que das 5 (7,7%) amostras do líquido do LBA positivas, a mediana foi de 38.55, para um intervalo de C_T entre 22.5 e 50.02. No que respeita às amostras de EB e EE, todas foram negativas por esta técnica molecular. A análise da **Figura 21** e do **Quadro 15** demonstrou, que os valores de C_T : máximo, mínimo e mediana, para o tipo de amostra biológica estudada, foram relativamente inferiores nos LBA.

Quadro 15. Comparação dos valores de C_T , segundo o tipo de amostra respiratória.

Tipo de amostra ^a	C_T ^b		
	Mínimo	Máximo	Mediana
SB	22.83	58.68	42.85
LBA	22.50	50.02	38.55
EB	0	0	0
EE	0	0	0

^a SB, secreção brônquica; LBA, lavado broncoalveolar; EB, escovado brônquico; EE, expectoração espontânea.

^b C_T , cycle threshold.

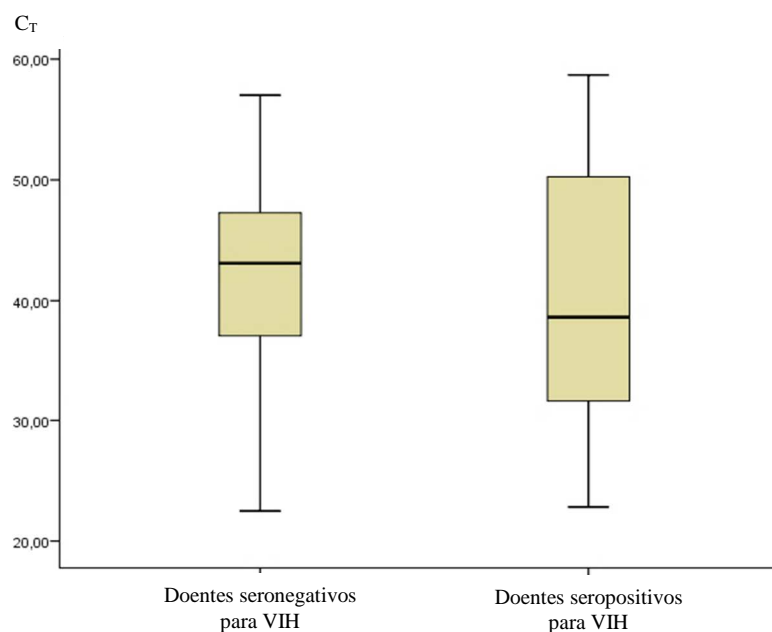


Figura 22. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C_T , quanto à condição de VIH.

Relativamente aos doentes seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência, verificou-se uma mediana de 43.1, com um intervalo de C_T entre 22.5 e 57.01. Já quanto aos doentes imunocomprometidos seropositivos para VIH, a mediana foi de 38.63, na qual 22.83 e 58.68 representam o valor mínimo e máximo de C_T , respectivamente (**Figura 22**). Tendo em consideração o **Quadro 16**, foi possível verificar que, os doentes seropositivos para VIH apresentaram uma mediana de valor de C_T inferior, comparativamente aos doentes seronegativos para VIH, no entanto, o valor mais baixo de C_T correspondeu a um doente seronegativo para VIH com outro tipo de imunodeficiência.

Quadro 16. Comparação dos valores de C_T , segundo a condição de VIH.

Condição de VIH ^a	C_T ^b		
	Mínimo	Máximo	Mediana
Seronegativo	22.50	57.01	43.10
Seropositivo	22.83	58.68	38.63

^a VIH, vírus da imunodeficiência humana.

^b C_T , cycle threshold.

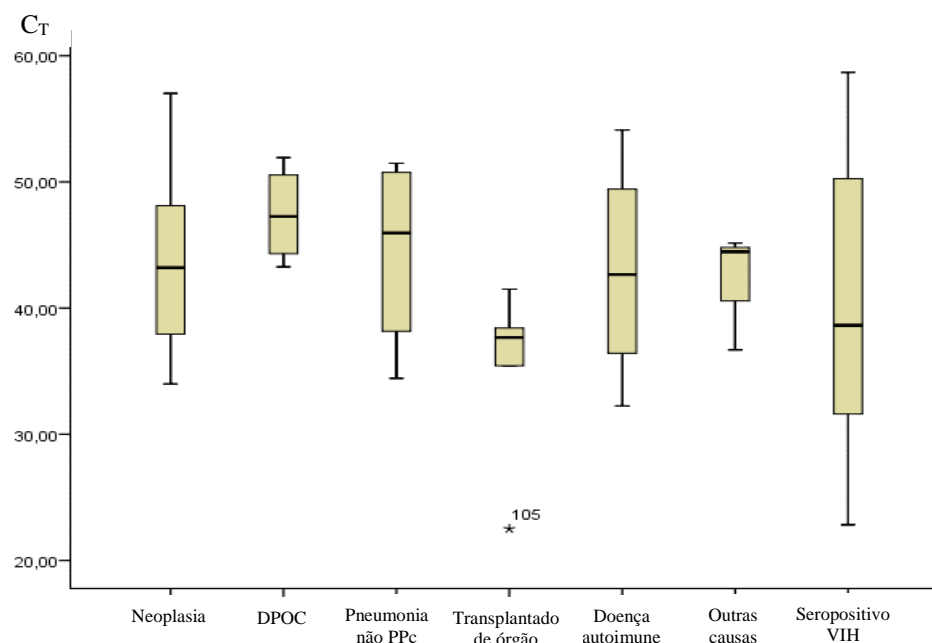


Figura 23. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C_T , pelas diferentes condições clínicas em estudo.

Detalhando os dados obtidos em C_T pelas diferentes condições clínicas definidas (**Figura 23**), observou-se, no caso dos doentes seronegativos para VIH com neoplasia, um intervalo de valor mínimo e máximo de C_T de 33.99 e 57.01, respectivamente, com uma mediana de 43.2; nos doentes com DPOC foram registados C_T entre 43.27 e 51.93, com uma mediana de 47.26; e no caso de pneumonia que não PPc, uma mediana de 45.95 (34.44 - 51.48). Não se apurou qualquer resultado positivo pela técnica de RT-qPCR nos doentes com diagnóstico de tuberculose. Já nos indivíduos com doença autoimune e transplante de órgão sólido, foram documentados valores de C_T entre 32.25 e 54.12, com uma mediana de 42.66, e de 22.5 e 41.5, com uma mediana de 37.67, respectivamente. Por fim, os doentes na condição clínica de outras causas apresentaram uma mediana de 44.46, para um valor mínimo de 36.69 e um valor máximo de 45.15. Os doentes seropositivos para VIH, evidenciaram intervalo de valores de C_T entre 22.83 e 58.68, com uma mediana de 38.63 (**Quadro 17**).

Quadro 17. Comparação dos valores de C_T , segundo as diferentes condições clínicas dos doentes.

Condição clínica ^a	C_T ^b		
	Mínimo	Máximo	Mediana
Neoplasia	33.99	57.01	43.20
DPOC	43.27	51.93	47.26
Pneumonia não PPc	34.44	51.48	45.95
Tuberculose	0	0	0
Doença autoimune	32.25	54.12	42.66
Transplantado de órgão	22.50	41.50	37.67
Outras causas	36.69	45.15	44.46
Seropositivos para VIH	22.83	58.68	38.63

^a DPOC, doença pulmonar obstrutiva crónica; PPc, pneumonia por *Pneumocystis*; VIH, vírus da imunodeficiência humana; Doentes seronegativos para VIH com outras causas, diabetes mellitus e fibrose pulmonar.

^b C_T , cycle threshold.

Da análise da correlação entre as variáveis C_T e as diversas condições clínicas da população em estudo, foi possível verificar que, os grupos correspondentes aos doentes seronegativos para VIH submetidos a transplante de órgão e seropositivos para VIH, foram os que apresentaram os menores valores de C_T , pertencendo o valor mínimo de C_T a um doente seronegativo para VIH submetido a transplante de órgão (**Quadro 17**).

Como é sabido, a presença de manifestações clínicas sugestivas de PPc aumentam substancialmente a probabilidade de desenvolvimento de doença por *P. jirovecii*. Assim sendo, analisando o grupo correspondente aos doentes seropositivos para VIH com suspeita clínica da PPc, verificou-se uma mediana de 33.03, cujo valor mínimo e máximo de C_T foi de 22.83 e 45.25, respectivamente (**Quadro 18**).

Já nas restantes condições subclínicas para PPc, isto é, portadores assintomáticos em que *P. jirovecii* apenas foi detectado através da técnica de PCR, apresentaram uma mediana de 43.27, com um intervalo de C_T entre 22.5 e 58.68 (**Figura 24**).

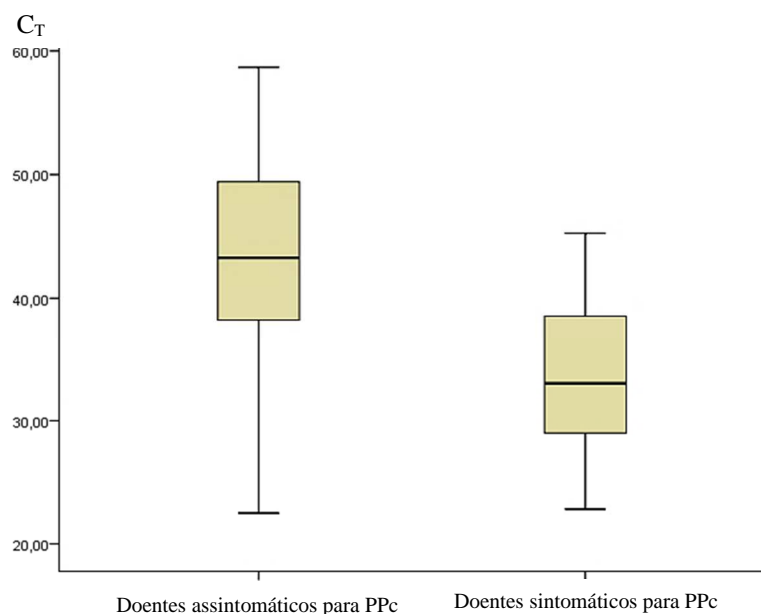


Figura 24. Distribuição dos resultados positivos obtidos em C_T , pelos doentes assintomáticos e sintomáticos para PPc.

Conforme se pode observar na **Figura 24** e no **Quadro 18**, tendo em conta esta variável, o valor máximo, bem como a mediana dos valores de C_T obtidos, foram significativamente inferiores nos doentes que apresentavam quadro clínico sugestivo de PPc.

Quadro 18. Comparação dos valores de C_T , quanto ao quadro clínico de PPc.

Quadro clínico de PPc ^a	C_T ^b		
	Mínimo	Máximo	Mediana
Assintomático	22.50	58.68	43.27
Sintomático	22.83	45.25	33.03

^a PPc, pneumonia por *Pneumocystis*.

^b C_T , cycle threshold

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pneumocystis jirovecii é causa comum de infecção respiratória em imunocomprometidos, sobretudo, nos doentes seropositivos para VIH. Contudo, a infecção por *P. jirovecii* constitui uma preocupação crescente nos imunocomprometidos seronegativos para VIH. Diversos estudos têm demonstrado que, doentes seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência podem ser portadores assintomáticos do microrganismo (Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005; Matos *et al.* 2006; Jiancheng *et al.* 2009; Roux *et al.* 2014).

O diagnóstico definitivo da PPc assenta, principalmente, no quadro clínico e na observação microscópica das formas morfológicas de *P. jirovecii* em amostras respiratórias, após aplicação de colorações citoquímicas ou fluorescentes.

Nas últimas décadas, a aplicação de técnicas de biologia molecular neste âmbito, contribuiu para a detecção cada vez mais sensível e eficiente de *P. jirovecii*, nomeadamente, no que respeita a amostras com carga parasitária mais baixa, e permitiu a identificação de casos de colonização/infecção assintomática (Matos *et al.* 2000; Sanches *et al.* 2012; Damiani *et al.* 2013; Riebold *et al.* 2014).

Tendo em atenção a importância actual do tema, o presente estudo teve como principal objectivo a detecção de *P. jirovecii* em amostras biológicas respiratórias de doentes Portugueses seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência e seropositivos para VIH, de um hospital central comunitário em Lisboa, através de duas técnicas moleculares, a *nested*-PCR e a RT-qPCR.

Neste projecto, DNA de *P. jirovecii* foi detectado em 39,7% do conjunto das 300 amostras biológicas estudadas.

Quanto às características demográficas da população em estudo, e no que se relaciona ao género, não se registaram variações assinaláveis. Relativamente aos grupos etários, nos doentes com idades compreendidas entre os 35 e os 44 anos e entre os 45 e os 54 anos, observaram-se frequências de infecção por *P. jirovecii* mais elevadas, correlacionadas com um maior número de doentes seropositivos para VIH nestes dois grupos etários. De sublinhar ainda que, 49% dos doentes em estudo apresentavam idade igual ou superior a 65 anos, dos quais 34% evidenciaram infecção. Vargas *et al.* num estudo realizado em adultos séniores imunocompetentes demonstrou a presença de colonização por *P. jirovecii* em 21,5% dos indivíduos em amostras de aspirados nasofaríngeos (Vargas *et al.* 2010). Também o processo de envelhecimento parece

facilitar a colonização pelo parasita, através de uma diminuição natural da imunidade celular (Mori *et al.* 2008).

No que respeita ao tipo de amostra biológica respiratória, da análise dos resultados obtidos por ambas as técnicas de PCR, verificou-se positividade em 44,7% (102/228) das amostras de SB, em 24,6% (16/65) das amostras do líquido do LBA e em 25% (1/4) das amostras de EB. Estatisticamente, foi possível verificar uma associação significativa entre a amostra de SB e a detecção do fungo ($P = 0.001$). Tais dados sugerem a importância da SB na detecção de infecção pelo microrganismo. Trajano *et al.* num estudo realizado com o objectivo de analisar o padrão de colonização brônquica em doentes com patologia inflamatória e neoplásica no pós-operatório, demonstraram uma frequência de colonização considerável em amostras de SB (Trajano *et al.* 1992). Assim sendo, a acumulação de secreções nos brônquios principais pode favorecer a presença de *P. jirovecii* nas amostras de SB, devido ao processo de respiração, tosse e como resultado de algumas patologias. Embora a SB seja obtida por meio de uma técnica invasiva, comparativamente ao LBA constitui, na maioria das vezes, um procedimento menos invasivo. Todavia, estudos subsequentes são necessários, uma vez que, a distribuição do parasita no aparelho respiratório é ainda desconhecida, dependendo também da experiência dos profissionais de saúde envolvidos na colheita, bem como do número e do volume das amostras obtidas (Sivam *et al.* 2011; Wilson *et al.* 2011).

Entre os doentes imunocomprometidos seropositivos para VIH, a infecção pelo agente patogénico foi detectada em 80,8% (21/26), dos quais, em 100% (10/10) das amostras biológicas de doentes com suspeita clínica de PPc e em 68,8% (11/16) das amostras de doentes com outras causas clínicas subjacentes. Uma associação estatística foi constatada entre os doentes seropositivos para VIH e a presença de DNA de *P. jirovecii*, com um nível de significância de $P < 0.001$. Elevadas frequências de colonização por *P. jirovecii*, têm sido também reportadas em alguns estudos entre os doentes seropositivos para VIH que se encontram hospitalizados por outra pneumonia que não PPc (68%), ou que faleceram por outras causas que não por PPc (46%) (Morris *et al.* 2004a; Davis *et al.* 2008).

Contudo, actualmente o foco de vários grupos de pesquisa científica sobre *P. jirovecii* é constituído por portadores assintomáticos, indivíduos seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência e até mesmo indivíduos imunocompetentes

saudáveis (Medrano *et al.* 2005; Ponce *et al.* 2010; Mori & Sugimoto 2012; Maini *et al.* 2013).

Portadores assintomáticos de *P. jirovecii* têm sido reconhecidos em doentes com neoplasia, DPOC, pneumonia que não PPc, doença autoimune, transplantado de órgão, entre outras, sugerindo que a imunodeficiência pode facilitar a colonização por *P. jirovecii* (Sing *et al.* 1999, 2000; Sepkowitz *et al.* 2002; Matos *et al.* 2003, 2006; Morris *et al.* 2004c; Vidal *et al.* 2006; Calderon *et al.* 2007).

Considerando os resultados obtidos neste estudo, nos indivíduos seronegativos para VIH, DNA do fungo oportunista foi detectado em 36,7% (51/139) dos casos de patologia neoplásica. Destes, 25% (2/8) representam neoplasias hematológicas e 37,4% (49/131) neoplasias sólidas. Segundo alguns trabalhos científicos, colonização por *P. jirovecii* pode ser observada em doentes sob terapêuticas imunossupressoras e/ou corticosteroides. As doenças de base compreendem, geralmente, as neoplasias hematológicas e as neoplasias sólidas primitivas ou metastáticas (Barbounis *et al.* 2005; Bollée *et al.* 2007; Mori *et al.* 2010). O risco de infecção depende fundamentalmente da natureza, intensidade e duração da imunossupressão, bem como dos factores de risco específicos a cada doente (Fishman 2001). Embora o factor predominante de diminuição imunitária desses doentes seja atribuída às terapêuticas, tem sido demonstrado que, estados avançados das neoplasias são caracterizados por um grau de disfunção imunitário induzido pela própria patologia, a qual, é indetectável na fase inicial de desenvolvimento (De La Horra *et al.* 2004; Chuang *et al.* 2007; Togashi *et al.* 2013), podendo facilitar a colonização por este agente patogénico e a sua participação na carcinogénese (De La Horra *et al.* 2004; Shebl *et al.* 2010).

Outras pneumonias, bacterianas, virais e fúngicas (que não por *P. jirovecii*), parecem apresentar igualmente risco acrescido de colonização por *P. jirovecii* (Helweg-Larsen *et al.* 2002; Azoulay *et al.* 2009; Jiancheng *et al.* 2009; Matsumura *et al.* 2012). Dos 37 doentes em estudo com pneumonia que não PPc, em 24,3% (9/37) foi detectado DNA de *P. jirovecii*.

Evidências recentes sugerem que, aproximadamente, 20 a 40% dos doentes com patologia pulmonar crónica são portadores assintomáticos de *P. jirovecii* (Maskell *et al.* 2003; Chuang *et al.* 2007). Considerando que estes doentes são produtores de expectoração, eles podem representar um reservatório de *P. jirovecii*, com potencial

capacidade de transmissão a hospedeiros susceptíveis. Rivero *et al.* reportou um caso de transmissão de *P. jirovecii* de um indivíduo sénior com bronquite crónica e produtor de expectoração, à sua esposa e a uma criança, por via aérea (Rivero *et al.* 2008). Calderón *et al.* detectaram a presença de colonização em 55% dos indivíduos com DPOC (Calderón *et al.* 2007). Já Morris *et al.* com base nas suas pesquisas demonstrou uma forte associação entre colonização por *P. jirovecii* e a severidade da obstrução aérea em indivíduos fumadores (37%), sugerindo que o microrganismo pode desempenhar um papel importante como co-factor na patogénese e na progressão da DPOC (Morris *et al.* 2004c, 2008a), bem como maior probabilidade dos doentes colonizados evoluírem para PPc (Morris & Norris 2012). Dos 45 doentes em estudo com diagnóstico de DPOC, 44,4% (20/45) revelaram resultado positivo pelas técnicas moleculares aplicadas.

Mycobacterium tuberculosis e *P. jirovecii* constituem infecções oportunistas comuns nos doentes seropositivos para VIH. No entanto, a co-infecção em doentes seronegativos para VIH é extremamente rara e apenas casos pontuais têm sido publicados (To *et al.* 2013; Suk *et al.* 2014). No presente estudo, foi detectada co-infecção apenas num (5,9%) dos 17 doentes seronegativos para VIH com diagnóstico de tuberculose. Suk *et al.* num estudo de caso de co-infecção TB e PPc num doente seronegativo para VIH sem doença de base, associou a relação à presença de uma linfocitopenia T CD4⁺ muito baixa (Suk *et al.* 2014). Estudos prévios têm descrito a correlação entre TB e linfocitopenia T CD4⁺, sobretudo em doentes seropositivos para VIH; no entanto, ainda se mantém por esclarecer se a diminuição é resultado da TB ou constitui um factor predisponente nos doentes seronegativos para VIH. Dos poucos casos relatados de co-infecção TB e PPc, sabe-se no entanto que, a pneumocistose pode ser fulminante nestes doentes seronegativos para VIH, resultando em alta mortalidade (Kony *et al.* 2000; Orlovic *et al.* 2001; Suk *et al.* 2014).

Nas doenças autoimunes foi detectada infecção pelo parasita em 31,2% (5/16) dos casos. Mekinian *et al.* divulgaram estudos com frequências de 16% de colonização por *P. jirovecii* em doentes com doenças autoimunes e identificou terapêuticas com corticosteroides em elevadas doses e uma diminuição na contagem de linfócitos como factores de risco de colonização (Mekinian *et al.* 2011). Já Fritzsche *et al.* demonstraram que doentes com doenças inflamatórias autoimunes, sobretudo, aqueles com idade acima dos 60 anos, apresentavam elevada frequência de colonização por *P.*

jirovecii. Ainda, destacando que, 28,5% desses doentes se encontravam colonizados pelo microrganismo, sem significativa influência da terapêutica por corticosteroides ou co-medicação imunossupressora (Fritzsche *et al.* 2012). Elevados níveis de colonização foram também reportados entre doentes com doenças reumáticas (54,5%) (Saito *et al.* 2004), e sob infliximab (25,6%) (Wissmann *et al.* 2011).

Nos indivíduos submetidos a transplante de órgão verificou-se uma frequência de infecção por *P. jirovecii* de 88,9% (8/9), com uma associação estatisticamente significativa ($P = 0.003$). Destes, todos (7/7; 100%) os doentes sujeitos a transplante renal foram positivos para o parasita, e em um (50%) dos dois casos de transplante cardíaco. Curiosamente, os doentes sujeitos a transplante renal parecem apresentar elevado risco de infecção sintomática e assintomática pelo agente patogénico (Schmoldt *et al.* 2008). Um aumento exponencial do número de casos de PPc e colonização entre os transplantados renais tem vindo a ser reportado por todo mundo. De Boer *et al.* através de uma revisão sistemática de mais de quinze artigos publicados desde 1980, sugerem que o aumento do número de casos de PPc e colonização, nesta condição clínica, está relacionado com três factores: inadequada profilaxia, frequente transmissão indivíduo-a-indivíduo pelo contacto e a inexistência de medidas de isolamento de doentes com PPc durante o período de hospitalização (De Boer *et al.* 2011). Muitos trabalhos relataram evidências epidemiológicas da existência de contacto e exposição entre doentes portadores de *P. jirovecii* com esta condição clínica (Chave *et al.* 1991; Schmoldt *et al.* 2008). Adicionalmente, resultados de genotipagem demonstraram que, cada aumento significativo era proveniente de um genótipo predominante de *P. jirovecii* (Schmoldt *et al.* 2008; Thomas *et al.* 2011; Coyle *et al.* 2012). De Boer *et al.* nos seus estudos em doentes seronegativos para VIH submetidos a transplante renal com suspeita de PPc, verificaram que o genótipo ITS Ne era predominante (De Boer *et al.* 2007). Já Le Gal *et al.* publicaram trabalhos enunciando o genótipo ITS Eg, como o mais frequente nesse mesmo tipo de condição clínica (Le Gal *et al.* 2012). Este achado, sugere que a transmissão inter-humana ocorre em ambiente hospitalar, assim como, possivelmente, fora dessa mesma esfera devido às facilidades de movimentação desses doentes. Sassi *et al.* demonstraram nas suas pesquisas que, em dois grupos de doentes submetidos a transplante renal, localizados em áreas geograficamente distintas na Europa, a PPc era ocasionada por um único genótipo de *P. jirovecii*. Este facto poderá

ser explicado pela existência de uma fonte comum de transmissão ou por diferenças na virulência de alguns genótipos de *P. jirovecii* (Le Gal *et al.* 2012; Sassi *et al.* 2012). Estudos adicionais são por isso necessários.

No grupo dos indivíduos seronegativos para VIH com outras condições clínicas, em quatro (50%) dos 8 doentes com diabetes mellitus foi detectado DNA de *P. jirovecii*, já nos doentes com fibrose pulmonar, nenhuma (0/3; 0%) amostra se revelou positiva. Os doentes com diabetes mellitus parecem apresentar uma maior propensão a infecções, e a evolução é também mais complicada, relativamente a outros grupos de doentes. Uma das possíveis causas relaciona-se com o défice da imunidade. Diversos distúrbios (quebra no sistema complemento, diminuição na resposta das citocinas após estímulo) na imunidade humoral inata têm sido descritos nos doentes diabéticos (Geerlings & Hoepelman 1999; Marques *et al.* 2002; Sanno *et al.* 2007). Apesar de em nenhum dos três doentes com fibrose pulmonar, ter sido detectada infecção por *P. jirovecii*, alguns estudos têm, porém, demonstrado que doentes com diversas outras doenças crónicas, nomeadamente fibrose pulmonar, apresentam risco acrescido de colonização pelo agente patogénico (Sinicco *et al.* 1996; Nevez *et al.* 1999, 2001; Vidal *et al.* 2006). A fibrose pulmonar é vista como o resultado de outros tipos de condições clínicas.

A variação das frequências observadas entre os diversos estudos de *P. jirovecii* pode ser explicada, pela localização geográfica e diferenças na exposição das populações, assim como, pelas diferentes combinações de metodologias de PCR, *primers* e sondas utilizadas e alvos moleculares amplificados, ou mesmo pelas diferentes características dos indivíduos em estudo, e o tipo de amostras biológicas analisadas (Brancart *et al.* 2005; Robberts *et al.* 2007; Gupta *et al.* 2009; Mekinian *et al.* 2011; Wilson *et al.* 2011; Le Gal *et al.* 2012).

Os resultados deste estudo e de estudos prévios de infecção por *P. jirovecii* suportam o conceito de uma elevada colonização por *P. jirovecii* pelos diversos grupos de condições clínicas em estudo e em alguns casos inclusivamente doença activa.

No total, dos 39,7% (119/300) resultados positivos, através da técnica de *nested*-PCR foi possível detectar *P. jirovecii* em 36% (108/300) das amostras biológicas e pela técnica de RT-qPCR em 18,3% (55/300). A frequência de resultados positivos obtidos pela técnica de *nested*-PCR decorreu no mesmo alinhamento, de estudos anteriormente realizados em Portugal (Matos *et al.* 2001, 2006), e reflecte o aumento da frequência do

microrganismo em amostras biológicas respiratórias, em especial, em doentes seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência, já reportado por outros autores (Maskell *et al.* 2003; Morris & Norris 2012; Maini *et al.* 2013). O aumento de tal frequência poderá ser explicado, pelo aperfeiçoamento das ferramentas de diagnóstico, o aumento da utilização de agentes imunossupressores, uma possível alteração dos agentes epidemiológicos associados à infecção pelo fungo oportunista, e períodos de hospitalização prolongados (Davis *et al.* 2008; Reid *et al.* 2011; Roux *et al.* 2014).

Da correlação de resultados entre ambas as técnicas moleculares, verificou-se que, 14,7% (44/300) (das amostras foram confirmadas como sendo positivas para o parasita, através do diagnóstico de ambas as técnicas moleculares, enquanto 21,3% (64/300) das amostras apenas foram confirmadas como sendo positivas para *P. jirovecii* pela técnica de *nested*-PCR, e 3,7% (11/300) amostras pela técnica de RT-qPCR; as restantes amostras (181/300; 60,3%) foram negativas para *P. jirovecii*. No conjunto, a concordância de resultados observada por ambas as técnicas de PCR foi de 75% (225/300). Relativamente à técnica de RT-qPCR, e no que se relaciona à infecção por *P. jirovecii*, verificou-se uma especificidade de 94,3% e sensibilidade de 40,7%, o valor preditivo positivo foi de 80%, e o valor preditivo negativo de 73,9%, tomando a *nested*-PCR como padrão de comparação.

Ambos os métodos demonstraram ser específicos para a detecção de *P. jirovecii*, no entanto, a *nested*-PCR parece ser mais sensível relativamente à RT-qPCR. Tais resultados são corroborados por outros estudos similares comparando *nested*-PCR e RT-qPCR (Flori *et al.* 2004; Alvarez-Martínez *et al.* 2006; Robberts *et al.* 2007; Bastien *et al.* 2008; Wilson *et al.* 2011; Sanches *et al.* 2012). Sanches *et al.* utilizando amostras de tecido pulmonar de morcegos e aplicando as técnicas de *nested*-PCR e RT-qPCR com outros alvos moleculares, verificaram a presença do microrganismo em 36,4% das amostras pela técnica de *nested*-PCR, e em 24,1% pela RT-qPCR. A concordância de resultados obtida foi de 68,2%. Já quanto à especificidade da RT-qPCR utilizada nesse estudo, foi de 84,6% e a sensibilidade de 39,4% (Sanches *et al.* 2012).

As diferenças identificadas no presente projecto, entre ambas as técnicas moleculares, pode ser devida ao facto de, a RT-qPCR ter como alvo o gene *KEX1* de cópia única (Kutty & Kovacs 2003; Esteves *et al.* 2009, 2012; Rohner *et al.* 2009; Wilson *et al.*

2011), comparativamente à *nested*-PCR que tem como alvo um gene multicópia *mtLSU rRNA* (Robberts *et al.* 2007; Brancart *et al.* 2009; Jiancheng *et al.* 2009; Le Gal *et al.* 2012); bem como, a população em estudo ser maioritariamente constituída por doentes seronegativos para VIH com factores de risco para infecção por *P. jirovecii* e, por isso, com cargas parasitárias tendencialmente baixas (Limper *et al.* 1989; Khot *et al.* 2009; Hauser *et al.* 2011).

É importante ainda referir que, doentes sintomáticos para PPc podem ser facilmente diagnosticados através da técnica de PCR, mas a facilidade de detectar casos assintomáticos ou subclínicos é muito menor, o que dificulta muitas das vezes a interpretação do resultado obtido laboratorialmente (Limper *et al.* 1989; Jarboui *et al.* 2009; Calderón *et al.* 2010). Técnicas moleculares de diagnóstico rápido, eficiente, com ausência de contaminação cruzada, possibilidade de detecção e quantificação de um número reduzido de formas morfológicas de *P. jirovecii*, e facilidade de implementação na rotina laboratorial, são por isso necessárias (Brancart *et al.* 2005; Lissen *et al.* 2006).

A RT-qPCR pode ser utilizada com o simples objectivo de detectar uma determinada sequência de ácido nucleico, ou de permitir a quantificação a cada ciclo de amplificação, através da intensidade de fluorescência medida, a qual é directamente proporcional à quantidade de produto formado na fase exponencial da reacção (Quiagen 2004-2006; Alvarez-Martínez *et al.* 2006). Assim sendo, a análise efectuada neste estudo demonstrou que, dos 300 doentes estudados, 55 foram positivos pela técnica de RT-qPCR.

Quanto à correlação entre as diversas condições clínicas definidas e os valores de C_T , no seguimento do verificado relativamente às frequências, também os grupos correspondentes aos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH submetidos a transplante de órgão e seropositivos para VIH, apresentaram maior carga parasitária de *P. jirovecii* nas amostras biológicas analisadas. Os resultados obtidos são corroborados por alguns estudos realizados (Larsen *et al.* 2002; Hauser *et al.* 2011). Harser *et al.* num estudo multicêntrico em indivíduos com factores de risco de infecção por *P. jirovecii*, aplicando uma técnica de RT-qPCR comercial distinta da utilizada no presente estudo, observaram uma média de valores de C_T de 25 para o grupo correspondente aos doentes seropositivos para VIH com PPc, e uma média de 34.2 no

grupo pertencente aos doentes seronegativos para VIH assintomáticos para PPc (Hauser *et al.* 2011).

Também do estudo realizado entre os doentes sintomáticos e assintomáticos para PPc foi possível verificar essa mesma associação, concordante com estudos prévios (Alanio *et al.* 2011; Hauser *et al.* 2011), em que, os valores de C_T foram significativamente inferiores nos doentes que apresentaram suspeita de PPc.

Na RT-qPCR um *threshold* definido, no caso de infecção por *P. jirovecii*, mantém-se ainda por determinar, podendo depender da patologia de base do doente (Botterel *et al.* 2012). Em algumas amostras biológicas do presente estudo obtiveram-se produtos de amplificação com ciclos mais tardios, provavelmente resultado da presença de cargas parasitárias mais baixas (Qiagen 2004-2006; Khot *et al.* 2009; Hauser *et al.* 2011).

Especial atenção deve ser dada aos doentes seronegativos para VIH com diferentes tipos de imunodeficiência, uma vez que, os mesmos podem desenvolver PPc com menores cargas parasitárias (Limper *et al.* 1989; Dei-Cas 2000; Durand-Joly *et al.* 2005; Matsumura *et al.* 2011; Muhlethaler *et al.* 2012), resultando em falsos negativos na observação microscópica (Azoulay *et al.* 2009; Alanio *et al.* 2011; Matsumura *et al.* 2011; Summah *et al.* 2013).

Assim, ambos os resultados positivos e negativos devem ser enquadrados e interpretados, tendo sempre em conta o quadro clínico, laboratorial e radiológico de cada doente. Os resultados positivos, particularmente, aqueles com valores de C_T mais elevados, devem ser compreendidos num contexto da sintomatologia do doente no sentido de possibilitar a distinção entre colonização e doença clínica activa (Huggett *et al.* 2008; Alanio *et al.* 2011; Hauser *et al.* 2011; Wilson *et al.* 2011). Também os resultados negativos podem advir de uma amostra biológica escassa, e consequentemente, número insuficiente de microrganismos para detecção (McTaggart *et al.* 2012).

Na RT-qPCR como todo o processo de amplificação e detecção ocorre num sistema fechado, a contaminação das reacções é praticamente negligenciável, quando comparada com a PCR “convencional” e em particular com a *nested*-PCR. O tempo de reacção é também mais reduzido e a metodologia simplificada. Por outro lado, a detecção do produto de amplificação na reacção de PCR “convencional” é feita no *end-point*, não logrando fins quantitativos, ao invés da RT-qPCR (Lu *et al.* 1995; Ribes *et*

al. 1997; Kaiser *et al.* 2001; Larsen *et al.* 2002; Flori *et al.* 2004; Mackay 2004; Qiagen 2004-2006; Brancart *et al.* 2005; Alvarez-Martínez *et al.* 2006; Arcenas *et al.* 2006; Linssen *et al.* 2006; Fillaux *et al.* 2008; Huggett *et al.* 2008; Jiancheng *et al.* 2009; Choukri *et al.* 2010; Sanches *et al.* 2013). A tecnologia da RT-qPCR reveste-se ainda, de grande precisão e maior objectividade, comparativamente a outras técnicas (Kaiser *et al.* 2001; Arcenas *et al.* 2006; Fujisawa *et al.* 2009); embora requeira um investimento inicial num equipamento específico, um menor custo pode ser obtido pela possibilidade de processamento de um elevado número de amostras biológicas em simultâneo (Alvarez-Martínez *et al.* 2006). A sua elevada reprodutibilidade e o aumento no mercado de testes comerciais disponíveis (Hauser *et al.* 2011), sugerem que a RT-qPCR, sustentada por um painel de controlo de qualidade indispensável, adquira o potencial para substituir algumas das técnicas microscópicas. Assim sendo, um *threshold* operacional deve ser estabelecido para uma técnica de RT-qPCR padronizada em estudos futuros.

A *nested*-PCR apesar de permitir a detecção de pequenas quantidades de DNA do fungo nas amostras biológicas (Flori *et al.* 2004; Alanio *et al.* 2011), e do seu baixo custo operacional, é uma técnica demorada, não automatizada que apresenta outros inconvenientes, nomeadamente, resultados não numéricos, e o facto de requerer processamento pós PCR para visualização do amplificado (Applied Biosystems).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, o procedimento ideal passará pela utilização da técnica de *nested*-PCR para detecção inicial e análise filogenética de *P. jirovecii*, com posterior quantificação das amostras positivas por RT-qPCR, quando necessário. Adicionalmente, a quantificação do DNA do microrganismo por RT-qPCR proporciona a determinação da concentração de *P. jirovecii* por microlitro de amostra biológica, em que a técnica uma vez optimizada, poderá revelar-se útil na diferenciação entre portadores assintomáticos e doença clínica (Alvarez-Martínez *et al.* 2006; Huggett *et al.* 2008; Alanio *et al.* 2011; Sanches *et al.* 2012).

A RT-qPCR aplicada no presente estudo tem como alvo molecular um gene nuclear de cópia única (*KEX1*), os resultados obtidos são por isso fiáveis para quantificação de unidades de carga fúngica, uma vez que, permite uma melhor proporcionalidade entre o sinal de amplificação e as unidades genómicas (Brancart *et al.* 2005). Futuramente, será realizada a conversão de C_T em cópias genómicas.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram claramente que, *P. jirovecii* pode facilmente colonizar indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente, doentes seronegativos para VIH submetidos a transplante de órgão e seropositivos para VIH. Para além de melhorar a compreensão sobre a frequência de infecção por *P. jirovecii*, pode ainda, contribuir para o estudo da transmissão da infecção no nosso país, contribuindo também para a melhoria do *Know-How* epidemiológico desta infecção.

O conhecimento do potencial papel dos portadores assintomáticos na transmissão de *P. jirovecii* a hospedeiros susceptíveis é essencial, de modo a permitir uma acção efectiva no controlo da infecção por *P. jirovecii* e prevenir o aumento futuro de casos da PPc. Esses doentes podem representar um reservatório possível para a circulação de organismos de *Pneumocystis* na comunidade.

Em virtude dos resultados obtidos, e tendo em conta, as evidências do potencial da técnica de RT-qPCR, possibilitando a abertura de novos campos de investigação, pretende-se, num futuro próximo, realizar estudos para a definição de valores de *cut-off* específicos, e assim determinar a sua verdadeira utilidade clínica, no diagnóstico diferencial entre PPc e colonização/infecção assintomática (Flori *et al.* 2004; Alanio *et al.* 2011; Damiani *et al.* 2013; Sanches *et al.* 2013). Muitos estudos adicionais de colonização e do possível papel patogénico de *P. jirovecii* em doentes seronegativos para VIH são por isso necessários.

A detecção e caracterização da colonização torna-se por isso fundamental. O presente estudo abre caminhos para a nossa compreensão dos reservatórios de *P. jirovecii* fomentando a pesquisa científica, no sentido de demonstrar o seu significado clínico e epidemiológico em indivíduos imunocomprometidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUYA, Y.L. BEAUMEL, A. LUCAS, S. DAGO-AKRIBI, A. COULIBALY, G. N'DHATZ, M. KONAN, J.B. YAPI, A. & DE COCK, K.M. (1992) *Pneumocystis carinii* pneumonia: an uncommon cause of death in African patients with acquired immunodeficiency syndrome. *American Review of Respiratory Disease*, 145 (3), pp. 617-620.
- ALANIO, A. DESOUBEAUX, G. SARFATI, C. HAMANE, S. BERGERON, A. AZOULAY, E. MOLINA, J.M. DEROUIN, F. & MENOTTI, J. (2011) Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 17 (10), pp.1531-1537.
- ALIOUAT, E.M. MAZARS, E. DEI-CAS, E. DELCOURT, P. BILLAUT, P. CAMUS, D. (1994) *Pneumocystis* cross infection experiments using scid mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41 (5), pp. 71S.
- ALIOUAT-DENIS, C.M. CHABÉ, M. DEMANCHE, C. ALIOUAT, E.M. VISCOGLIOSI, E. GUILLOT, J. DELHAES, L. DEI-CAS, E. (2008) *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, Genetics and Evolution*, 8 (5), pp. 708-726.
- ALIOUAT-DENIS, C.M. MARTINEZ, A. ALIOUAT, E.M. POTTIER, M. GANTOIS, N. DEI-CAS, E. (2009) The *Pneumocystis* life cycle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (3), pp. 419-426.
- ALVAREZ-MARTÍNEZ, M.J. MIRÓ, J.M. VALLS, M.E. MORENO, A. RIVAS, P.V. SOLÉ, M. BENITO, N. DOMINGO, P. MUNOZ, C. RIVERA, E. ZAR, H.J. WISSMANN, G. DIEHL, A.R.S. PROLLA, J.C. DE ANTA, M.T.J. GATELL, J.M. WILSON, P.E. MESHNICK, S.R. & THE SPANISH PCP WORKING GROUP (2006) Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56 (2), pp. 153-160.
- ANEKTHANANON, T. RATANASUWAN, W. TECHASATHIT, W. RONGRUNGRUANG, Y. SUWANAGOOL, S. (2004) HIV infection/acquired immunodeficiency syndrome at Siriraj Hospital, 2002: time for secondary prevention. *Journal Medical Association Thailand*, 87 (2), pp. 173-179.
- APPLIED BIOSYSTEMS, Real-time PCR Vs. Traditional PCR. [www]. http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf, [30/09/2014].
- ARCENAS, R.C. UHL, J.R. BUCKWALTER, S.P. LIMPER, A.H. CRINO, D. ROBERTS, G.D. WENGENACK, N.L. (2006) A real-time polymerase chain reaction

assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54 (3), pp. 169-175.

ARMSTRONG, W. MESHNICK, S. KAZANJIAN, P. (2000) *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes and Infection*, 2 (1), pp. 61-67.

AZOULAY, E. BERGERON, A. CHEVRET, S. BELE, N. SCHLEMMER, B. MENOTTI, J. (2009) Polymerase chain reaction for diagnosing *Pneumocystis* pneumonia in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest*, 135 (3), pp. 655-661.

BANERJI, S. LUGLI, E.B. MILLER, R.F. WAKEFIELD, A.E. (1995) Analysis of genetic diversity at the *aro* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42 (6), pp. 675-679.

BARBOUNIS, V. APERIS, G. GAMBLETSAS, E. KOUMAKIS, G. DEMIRIS, M. VASSILOMNOLAKIS, M. & EFREMIDIS, A. (2005) *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with solid tumors and lymphomas: predisposing factors and outcome. *Anticancer Research*, 25 (1B), pp. 651-656.

BARRY, S.M. & JOHNSON, M.A. (2001) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV Medicine*, 2 (2), pp. 123-132.

BARTLETT, M.S. & SMITH, J.W. (1991) *Pneumocystis carinii*, an opportunist in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (2), pp. 137-149.

BASELSKI, V.S. ROBISON, M.K. PIFER, L.W. & WOODS, D.R. (1990) Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using cellufluor staining. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (2), pp. 393-394.

BASTIEN, P. PROCOP, G.W. & REISCHL, U. (2008) Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (6), pp. 1897-1900.

BAUGHMAN, R.P. DOHN, M. FRAME, P. (1991) Generalised immune response to *Pneumocystis carinii* infection in the lung. *Journal of Protozoology*, 38 (6), pp. 187-188.

BAUGHMAN, R.P. DOHN, M. FRAME, P. (1994) The continuing utility of bronchoalveolar lavage to diagnose opportunistic infection in AIDS patients. *American Journal Medicine*, 97 (6), pp. 515-522.

BAUGHMAN, R.P. STROHOFER, S.S. CLINTON, B.A. NICKOL, A.D. FRAME, P.T. (1989) The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Archives Pathology Laboratory Medicine*, 113 (9), pp. 1062-1065.

- BEARD, C.B. CARTER, J.L. KEELY, S.P. HUANG, L. PIENIAZEK, N.J. MOURA, I.N.S. ROBERTS, J.M. HIGHTOWER, A.W. BENS, M.S. FREEMAN, A.R. LEE, S. STINGER, J.R. DUCHIN, J.S. DEL RIO, C. RIMLAND, D. BAUGHMAN, R.P. LEVY, D.A. DIETZ, V.J. SIMON, P. & NAVIN, T.R. (2000) Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerging Infectious Diseases*, 6 (3), pp. 265-272.
- BEARD, C.B. ROUX, P. NEVEZ, G. HAUSER, P.M. KOVACS, J.A. UNNASCH, T.R. & LUNDGREN, B. (2004) Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (10), pp. 1729-1735.
- BECK, J.M. & CUSHION, M.T. (2009) *Pneumocystis* workshop: 10th anniversary summary. *Eukaryotic Cell*, 8 (4), pp. 446-460.
- BECK, J. & HARMSSEN, A. (1998) Lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii*. *Seminars Respiratory Infections*, 13 (4), pp. 330-338.
- BENTO, D.P. ESTEVES, F. MATOS, O. MIRANDA, A.C. VENTURA, F. ARAÚJO, C. & MANSINHO, K. (2013) Coexistência de infecções oportunistas pulmonares num doente com infeção por vírus da imunodeficiência humana e uma forma persistente de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*: caso clínico. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 19 (3), pp. 129-133.
- BIGBY, T. MARGOLSKIE, D. & CURTIS, J. (1986) The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *American Review Respiratory Diseases*, 133 (4), pp. 515-518.
- BLUMENFELD, W. BASGOZ, N. OWEN, W.F. & SCHMIDT, D.M. (1988) Granulomatous pulmonary lesions in patients with AIDS and *Pneumocystis carinii* infection. *Annals of Internal Medicine*, 109 (6), pp. 505-507.
- BOLLÉE, G. SARFATI, C. THIÉRY, G. BERGERON, A. DE MIRANDA, S. MENOTTI, J. DE CASTRO, N. TAZI, A. SCHLEMMER, B. AZOULAY, É. (2007) Clinical picture of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in cancer patients. *Chest*, 132 (4), pp. 1305-1310.
- BOONDIREKE, S. MUNGTHIN, M. TAN-ARIYA, P. BOONYONGSUNCHAI, P. NAAGLOR, T. WATTANATHUM, A. TREEWATCHAREEKORN, S. & LEELAYOOVA, S. (2010) Evaluation of sensitivity of multiplex PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis jirovecii* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (9), pp. 3165-3168.
- BOTTEREL, F. CABARET, O. FOULET, F. CORDONNIER, C. COSTA, J.M. & BRETAGNE, S. (2012) Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii*

DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (2), pp. 227-231.

BOZZETTE, S.A. SATTler, F.R. CHIU, J. WU, A.W. GLUCKSTEIN, D. KEMPER, C. BARTOK, A. NIOSI, J. ABRAMSON, I. COFFMAN, J. HUGHLETT, C. LOYA, R. CASSENS, B. AKIL, B. TZE-CHIANG, M. BOYLEN, C.T. NIELSEN, D. RICHMAN, D.D. TILLES, J.G. LEEDOM, J. MCCUTCHAN, J.A. & CALIFORNIA COLLABORATIVE TREATMENT GROUP (1990) A controlled trial of early adjunctive treatment with corticosteroids for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 323 (21), pp. 1451-1457.

BRANCART, F. RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H. FONTEYNE, P.A. PERES-BOTA, D. LIESNARD, C. (2005) Quantitative taqman PCR for detection of *Pneumocystis jiroveci*. *Journal of Microbiological Methods*, 61 (3), pp. 381-387.

BROADDUS, C. DAKE, M.D. STULBARG, M.S. BLUMENFELD, W. HADLEY, W.K. GOLDEN, J.A. & HOPEWELL, P.C. (1985) Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 102 (6), pp. 747-752.

BUTT, A.A. MICHAELS, S. & KISSINGER, P. (2002) The association of serum lactate dehydrogenase level with selected opportunistic infections and HIV progression. *Internal Journal of Infectious Disease*, 6 (3), pp. 178-181.

CALDERÓN, E.J. (2009) Epidemiology of *Pneumocystis* infection in human. *Journal of Medical Mycology*, 19 (4), pp. 270-275.

CALDERÓN, E.J. (2010) *Pneumocystis* infection: seeing beyond the tip of the iceberg. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (3), pp. 354-356.

CALDERÓN, E.J. & DEI-CAS, E. (2010) *Pneumocystis* infection: unraveling the colonization-to-disease shift. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8 (3), pp. 259-263

CALDERÓN, E.J. GUTIÉRREZ-RIVERO, S. DURAND-JOLY, I. & DEI-CAS, E. (2010) *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8 (6), pp. 683-701.

CALDERÓN, E.J. RIVERO, L. RESPALDIZA, N. MORILLA, R. MONTES-CANO, M.A. FRIAZA, V. MUÑOZ-LOBATO, F. VARELA, J.M. MEDRANO, F.J. & DE LA HORRA, C. (2007) Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jiroveci*. *Clinical Infectious Diseases*, 45 (2), pp. e17-e19.

- CALDERÓN, E.J. VARELA, J.M. MEDRANO, F.J. NIETO, V. RESPALDIZA, N. DE LA HORRA, C. & DEI-CAS, E. (2002) Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist*, 153 (3), pp. 303-310.
- CALIENDRO, A.M. HEWITT, P.L. ALLEGA, J.M. KEEN, A. RUOFF, K.L. & FERRARO, M.J. (1998) Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (4), pp. 979-982.
- CARINI, A. (1910) Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. *Boletim da Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo*, 18 (8), pp.204.
- CASANOVA-CARDIEL, L. & LEIBOWITZ, M.J. (1997) Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44 (6), pp. 28S.
- CASTRO, J.G. & MORRISON-BRYANT, M. (2010) Management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV infected patients: current options, challenges and future directions. *HIV/AIDS – Research and Palliative Care*, 2, pp. 123-134.
- CATHERINOT, E. LANTERNIER, F. BOUGNOUX, M.E. LECUIT, M. COUDERC, L.J. LORTHOLARY, O. (2010) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Infectious Disease Clinics of North America*, 24 (1), pp. 107-138.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1980) *Pneumocystis carinii* pneumonia. Los Angeles, *MM.W.R.*, 30, pp. 250.
- CENTRE FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2013) Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. [www]. Disponível em: http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/ivguidelines/adult_o.pdf. [24/07/2014].
- CERE, N. DROUET-VIARD, F. DEI-CAS, E. CHANGELOUP, N. COUDERT, P. (1997) In útero transmission of *Pneumocystis carinii* sp.f. *oryctolagi*. *Parasite*, 4 (4), pp. 325-330.
- CHABÉ, M. DURAND-JOLY, I. DEI-CAS, E. (2012) La transmission des infections à *Pneumocystis*. *Médecine/Sciences*, 6-7 (28), pp. 599-604.
- CHAGAS, C. (1909) Nova tripanosomíaze humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1 (2), pp. 159-218.
- CHAVE, J.P. DAVID, S. WAUTERS, J.P. VAN MELLE, G. FRANCIOLI, P. (1991) Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. *AIDS*, 5 (8), pp. 927-932.

- CHEUNG, Y.F. CHAN, C.F. LEE, C.W. LAU, Y.L. (1994) An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in children with malignancy. *Journal Paediatric Child Health*, 30 (2), pp. 173-175.
- CHOUKRI, F. MENOTTI, J. SARFATI, C. LUCET, J. NEVEZ, G. GARIN, Y.J.F. DEROUIN, F. & TOTET, A. (2010) Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 51 (3), pp. 259-265.
- CHUANG, C. ZHANHONG, X. YINYIN, G. QINGSI, Z. SHUQING, Z. NANSHAN, Z. (2007) Unsuspected *Pneumocystis* pneumonia in an HIV-seronegative patient with untreated lung cancer: circa case report. *Journal of Medical Case Reports*, 1 (115), pp. 1-5.
- COHEN, O.J. & STOECKLE, M.Y. (1991) Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 151 (6), pp. 1205-1214.
- CORDANI, S. MANNA, A. VIGNALI, M. TASCINI, C. (2008) Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool in patients with haematological malignancies and pneumonia. *Le Infezioni in Medicina*, 16 (4), pp. 209-213.
- CORNILLOT, E. KELLER, B. CUSHION, M. MÉTÉNIER, G. VIVARÉS, C. (2002) Fine analysis of the *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* genome by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis. *Gene*, 293 (1-2), pp. 87-95.
- COSTA, M.C. ESTEVES, F. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2006) Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (6), pp. 1246-1249.
- COSTA, M.C. GASPAR, J. MANSINHO, K. ESTEVES, F. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2005) Detection of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37 (10), pp. 766-771.
- COSTA, M.C. HELWEG-LARSEN, J. LUNDGREN, B. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2003) Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis* pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22 (5), pp. 516-520.
- COYLE, P.V. MCCAUGHEY, C. NAGER, A. MCKENNA, J. O'NEILL, H. FEENEY, S.A. FAIRLEY, D. WATT, A. COX, C. & CURRAN, T. (2012) Rising incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia suggests iatrogenic exposure of immune-compromised patients may be becoming a significant problem. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 7), pp. 1009-1015.

- CRAKER, L.R. (2010) Late presentation of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia after cardiac transplantation. *BMJ Case Reports*, pp. 1-3.
- CRANS, C.A. & BOISELLE, P.M. (1999) Imaging features of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Critical Review Diagnostic Imaging*, 40 (4), pp. 251-284.
- CRUICKSHANK, B. (1975) Pulmonary granulomatous pneumocystosis following renal transplantation. *American Journal of Clinical Pathology*, 63 (3), pp. 384-390.
- CUSHION, M.T. (2004) *Pneumocystis*: unraveling the cloak of obscurity. *Trends in Microbiology*, 12 (5), pp. 243-249.
- CUSHION, M.T. (2010) Are members of the fungal genus *Pneumocystis* (a) commensals; (b) opportunists; (c) pathogens; or (d) all of the above? *PLOS Pathogens*, 6 (9), pp. 1-4.
- CUSHION, M.T. ASHBAUGH, A.D. COLLINS, M.S. & WALZER, P.D. (2008) In vivo efficacy of echinocandins in a mouse model of *Pneumocystis murina* pneumonia. 10th Workshops Opportunistic Protists, pp. 28-30.
- CUSHION, M.T. HARMSSEN, A. MATSUMOTO, Y. STRINGER, J.R. WAKEFIELD, A.E. YAMADA, M. (1994) Recent advances in the biology of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Medical Veterinary Mycology*, 32 (S1), pp. 217-228.
- CUSHION, M.T. KEELY, S.P. & STRINGER, J.R. (2004) Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. *Mycologia*, 96 (3), pp. 429-438.
- CUSHION, M.T. LINKE, M.J. ASHBAUGH, A. SESTERHENN, T. COLLINS, M.S. LYNCH, K. BRUBAKER, R. WALZER, P.D. (2010) Echinocandin treatment of *Pneumocystis* pneumonia in rodent models deplete cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection. *PLOS ONE*, 5 (1), e8524.
- CUSHION, M.T. RUFFOLO, J.J. LINKE, M.J. WALZER, P.D. (1985a) *Pneumocystis carinii*: growth variables and estimates in the A549 and WI-38 VA13 human cell lines. *Experimental Parasitology*, 60 (1), pp. 43-54.
- CUSHION, M.T. STANFORTH, D. LINKE, M.J. WALZER, P.D. (1985b) Method of testing the susceptibility of *Pneumocystis carinii* to antimicrobial agents in vitro. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 28 (6), pp. 796-801.
- DA SILVA, R. BAZZO, M. BORGES, A. (2007) Induced sputum versus bronchoalveolar lavage in the diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11 (6), pp. 549-553.

- DA SILVA, R.M. & TOMIO, D. (2005) Pneumocistose. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, 34 (4), pp. 85-91.
- DALPKE, A.H. HOFKO, M. & ZIMMERMANN, S. (2013) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* on the fully automated BD MAX platform. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (7), pp. 2337-2343.
- DAMIANI, C. LE GAL, S. DA COSTA, C. VIRMAUX, M. NEVEZ, G. & TOTET, A. (2013) Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1→3)-β-D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (10), pp. 3380-3388.
- DAVIS, J.L. WELSH, D.A. BEARD, C.B. JONES, J.L. LAWRENCE, G.G. FOX, M.R. CROTHERS, K. MORRIS, A. CHARBONNET, D. SWARTZMAN, A. HUANG, L. (2008) *Pneumocystis* colonization is common among hospitalized HIV infected patients with non-*Pneumocystis* pneumonia. *Thorax*, 63 (4), pp. 329-334.
- DE ARMAS, R.Y. WISSMANN, G. MULLER, A.L. PEDERIVA, M.A. BRUM, M.C. BRACKMANN, R.L. CAPÓ DE PAZ, V. & CALDERÓN, E.J. (2011) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in developing countries. *Parasite*, 18 (3), pp. 219-228.
- DE BOER, M.G. BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, L.E. GAASBEEK, A. BERGER, S.P. GELINCK, L.B. VAN HOUWELINGEN, H.C. VAN DEN BROEK, P. KUIJPER, E.J. KROON, F.P. & VANDENBROUCKE, J.P. (2007) An outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? *Clinical Infectious Diseases*, 44 (9), pp. 1143-1149.
- DE BOER, M.G. DE FIJTER, J.W. & KROON, F.P. (2011) Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review. *Medical Mycology*, 49 (7), pp. 673-680.
- DE LA HORRA, C. VARELA, J.M. FERNÁNDEZ-ALONSO, J. MEDRANO, F.J. RESPALDIZA, N. MONTES-CANO, M.A. & CALDERÓN, E.J. (2004) Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. *European Journal of Clinical Investigation*, 34 (3), pp. 229-235.
- DE LORENZO, L.J. MAGUIRE, G.P. WORMSER, G.P. DAVIDIAN, M.M. & STONE, D.J. (1985) Persistence of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. Evaluation of therapy by follow-up transbronchial lung biopsy. *Chest*, 88 (1), pp. 79-83.
- DE SOUZA, W. & BENCHIMOL, M. (2005) Basic biology of *Pneumocystis carinii* – a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (8), pp. 903-908.

- DE STEFANO, J.A. MYERS, J. DU PONT, D. FOY, J.M. THEUS, S.A. & WALZER, P.D. (1998) Cell Wall antigens of *Pneumocystis carinii* trophozoites and cysts: purification and carbohydrates analysis of these glycoproteins. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45 (3), pp. 334-343.
- DEI-CAS, E. (2000) *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Medical Mycology*, 38 (S1), pp. 23-32.
- DEI-CAS, E. ALIOUAT, E.M. & CAILLIEZ, J. (2004) Cellular structure. In: *Pneumocystis pneumonia*, 3rd ed., Walzer, P.D. (Ed), New York: Marcel Dekker, pp.61-94.
- DEI-CAS, E. FEURISSE, L. ALIOUAT, E.M. CAPON, J.B. CAILLIEZ, J.C. CREUSY C. (1998) XXIV Morphological and ultrastructural methods for *Pneumocystis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2), pp. 185-189.
- DEI-CAS, E. SOULEZ, B. CAMUS, D. (1989) Ultrastructural study of *Pneumocystis carinii* in explants cultures of rabbit lung and cultures with or without feeder cells. *Journal of Protozoology*, 36 (1), pp. 55S-57S.
- DELANOË, P., & DELANOË, M. (1912) Sur les rapports des kystes de Carinii du poumon des rats avec le *Trypanossoma lewissi*. C.R. *Académie des Sciences Paris*, 155, pp. 658-660.
- DEROUICHE, S. DEVILLE, M. TAYLOR, M.L. AKBAR, H. GUILLOT, J. CARRETO-BINAGHI, L.E. POTTIER, M. ALIOUAT, E.M. ALIOUAT-DENIS, C.M. DEI-CAS, E. DEMANCHE, C. (2009) *Pneumocystis* diversity as a phylogeographic tool. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (1), pp. 112-117.
- DICKSON, S.J. BATSON, S. COPAS, A.J. EDWARDS, S.G. SINGER, M. MILLER, R.F. (2007) Survival of HIV-infected patients in the intensive care unit in the era of highly active antiretroviral therapy. *Thorax*, 62 (11), pp. 964-968.
- DIMONTE, S. BERRILLI, F. ORAZI, C. ALFONSO, R. PLACCO, F. BORDI, E. PERNO, C.F. CAVE, D. (2013) Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and imunocompetente patients in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, pp. 68-72.
- DOSKAYA, M. CANER, A. DEGIRMENCI, A. WENGENACK, N.L. YOLASIGMAZ, A. TURGAY, N. TOZ, S.O. & GURUZ, Y. (2011) Degree and frequency of inhibition in a routine real-time PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in Turkey. *Journal of Medical Microbiology*, 60 (Pt 7), pp. 937-944.

- DURAND-JOLY, I. CHABE, M. SOULA, F. DELHAES, L. CAMUS, D. DEI-CAS, E. (2005) Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45 (3), pp. 405-410.
- EDMAN, J.C. EDMAN, U. CAO, M. LUNDGREN, B. KOVACS, J.A. & SANTI, D.V. (1989a) Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 86 (22), pp. 8625-8629.
- EDMAN, J.C. KOVACS, J.A. MASUR, H. SANTI, D.V. ELWOOD, H.J. & SOGIN, M.L. (1988) Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334 (6182), pp. 519-522.
- EDMAN, J.C. KOVACS, J.A. MASUR, H. SANTI, D.V. ELWOOD, H.J. & SOGIN, M.L. (1989b) Ribosomal RNA genes of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Protozoology*, 36 (1), pp. 18S-20S.
- ELVIN, K.M. BJORKMAN, A. LINDER, E. HEURLIN, N. & HJERPE, A. (1988) *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *BMJ*, 297 (6645), pp. 381-384.
- ENG, R.H. BISHBURG, E. & SMITH, S.M. (1987) Evidence for destruction of lung tissues during *Pneumocystis carinii* infection. *Archives of Internal Medicine*, 147 (4), pp. 746-749.
- ENGELBERG, L.A. LERNER, C.W. TAPPER, M.L. (1984) Clinical features of *Pneumocystis pneumonia* in the acquired immune deficiency syndrome. *American Review of Respiratory Disease*, 130 (4), pp. 689-694.
- ENOMOTO, T. AZUMA, A. KOHNO, A. KANEKO, K. SAITO, H. KAMETAKA, M. USUKI, J. GEMMA, A. KUDOH, S. & NAKAMURA, S. (2010) Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromized patients with and without HIV infection. *Respirology*, 15 (1), pp. 126-131.
- ERIKSSON, O.E. (1994) *Pneumocystis carinii* a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). *Systema Ascomycetum*, 13, pp. 165-180.
- ESTEVEES, F. (2010) Identificação de múltiplos marcadores polimórficos em *Pneumocystis jirovecii*: relação com a evolução clínica. Tese de dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- ESTEVEES, F. ANTUNES, F. MATOS, O. (2014a) *Pneumocystis* e pneumocistose: o agente patogénico e a doença (105 anos de investigação). *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 10 (1), pp. 16-22.

- ESTEVEES, F. GASPAR, J. SOUSA, B. ANTUNES, F. MANSINHO, K. & MATOS, O. (2012) *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping in pooled DNA samples: a new approach for clinical and epidemiological studies. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (6), pp. E177-E184.
- ESTEVEES, F. LEE, C.H. DE SOUSA, B. BADURA, R. SERINGA, M. FERNANDES, C. GASPAR, J.F. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2014b) (1-3)-Beta-D-glucano in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) in HIV-infected patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infections Diseases*, 33 (7), pp. 1173-1180.
- ESTEVEES, F. MEDRANO, F.J. DE ARMAS, Y. WISSMANN, G. CALDERÓN, E.J. & MATOS, O. (2014c) *Pneumocystis* and pneumocystosis: first meeting of experts from Latin-American and Portuguese-speaking countries – a mini-review. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12 (5), pp. 545-548.
- ESTEVEES, F. TAVARES, A. COSTA, M.C. GASPAR, J. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2009) Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of *Pneumocystis jirovecii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infections Diseases*, 28 (2), pp. 175-178.
- ETOH, K. (2008) Evaluation of a real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Kurume Medical Journal*, 55 (3,4), pp. 55-62.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL/WHO REGIONAL OFFICE FOR EUROPE (2012) HIV/AIDS surveillance in Europe 2012 – Surveillance report. [www]. Disponível em: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0018/235440/e96953.pdf, [02/09/2014].
- EVANS, R. JOSS, A.W. PENNINGTON, T.H. & HO-YEN, D.O. (1995) The use of a nested polymerase chain reaction for detecting *Pneumocystis carinii* from lung and blood in rat and human infection. *Journal of Medical Microbiology*, 42 (3), pp. 209-213.
- FAN, L.C. LU, H.W. CHENG, K.B. LI, H.P. XU, J.F. (2013) Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review. *PLOS ONE*, 8 (9), pp. 1-8.
- FESTIC, E. GAJIC, O. LIMPER, A.H. AKSAMIT, T.R. (2005) Acute respiratory failure due to *Pneumocystis pneumonia* in patients without human immunodeficiency virus infection: outcome and associated features. *Chest*, 128 (2), pp. 573-579.
- FILLAUX, J. MALVY, S. ALVAREZ, M. FABRE, R. CASSAING, S. MARCHOU, B. LINAS, M.D. BERRY, A. (2008) Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Microbiological Methods*, 75 (2), pp. 258-261.

- FINKELMAN, M.A. (2010) *Pneumocystis jirovecii* infection: cell wall (1→3)-β-D-glucano biology and diagnostic utility. *Critical Review in Microbiology*, 36 (4), pp. 271-281.
- FISCHL, M.A. DICKINSON, G.M. LA VOIE, L. (1988) Safety and efficacy of sulfamethoxazole and trimethoprim chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS. *JAMA*, 259 (8), pp. 1185-1189.
- FISHMAN, J.A. (1994) Radiological approaches to the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. In: *Pneumocystis carinii* pneumonia. 2ª ed., Walzer P.D., New York, Marcel Dekker, pp. 311-359.
- FISHMAN, J.A. (1998a) Prevention of infection due to *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (5), pp. 995-1004.
- FISHMAN, J.A. (1998b) Treatment of infection due to *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (6), pp. 1309-1314.
- FISHMAN, J.A. (2001) Prevention of infection caused by *Pneumocystis carinii* in transplant recipients. *Immunocompromised Hosts*, 33 (8), pp. 1397-1405.
- FISHMAN, J.A. (2002) *Pneumocystis carinii* and parasitic infection in the immunocompromised host. In: R.H. Rubin S.Y Lowell (ed.), *Clinical approach to infection in the compromised host*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 265-334.
- FISK, D.T. MESHNICK, S. & KAZANJIAN, P.H. (2003) *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Disease*, 36 (1), pp. 70-78.
- FLEURY, J. ESCUDIER, E. POCHOLLE, M.J. CARRE, C. BERNAUDIN, F. (1985) Cell population obtained by bronchoalveolar lavage in *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Acta Cytology*, 29 (5), pp. 721-726.
- FLORI, P. BELLETE, B. DURAND, F. RABERIN, H. CAZORLA, C. HAFID, J. LUCHT, F. & SUNG, R.T.M. (2004) Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (7), pp. 603-607.
- FRANKLIN, C.L. & RILEY, L.K. (1999) *Pneumocystis carinii*: history, classification, clinical diseases, pathology, diagnosis and control in laboratory animals. *Newsletter American Committee on Laboratory Animal Diseases*, 20, pp. 1.
- FRENKEL, J.K. GOOD, J.T. SHULTZ, J.A. (1966) Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse, and chemotherapy. *Laboratory Investigation*, 15 (10), pp. 1559-1577.

- FRITZSCHE, C. RIEBOLD, D. MUNK-HARTIG, A. KLAMMT, S. NEECK, G. REISINGER, E. (2012) High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among patients with autoimmune inflammatory diseases and corticosteroid therapy. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 41 (3), pp. 208-213.
- FUJII, T. NAKAMURA, T. IWAMOTO, A. (2007) *Pneumocystis* pneumonia in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13 (1), pp. 1-7.
- FUJISAWA, T. SUDA, T. MATSUDA, H. INUI, N. NAKAMURA, Y. SATO, J. TOYOSHIMA, M. NAKANO, Y. YASUDA, K. GEMMA, H. HAYAKAWA, H. & CHIDA, K. (2009) Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Respirology*, 14 (2), pp. 203-209.
- GAL, S.L. HÉRY-ARNAUD, G. RAMEL, S. VIRMAUX, M. DAMIANI, C. TOTET, A. & NEVEZ, G. (2010) *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42 (3), pp. 225-227.
- GARBE, T.R. & STRINGER, J.R. (1994) Molecular characterization of clustered variants of genes encoding major surface antigens of human *Pneumocystis carinii*. *Infectious Immunology*, 62 (8), pp. 3092-3101.
- GEERLING, S.E. HOEPELMAN, A.I. (1999) Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26 (3-4), pp. 259-265.
- GENVRESSE, I. AKRIVAKIS, K. FLATH, B. SPATH-SCHWALBE & POSSINGER, K. (1998) *Pneumocystis carinii* pneumonia in breast cancer. *Annals Oncology*, 9 (5), pp. 573-574.
- GIGLIOTTI, F. (1992) Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Infectious Disease*, 165 (2), pp. 329-336.
- GIGLIOTTI, F. HARMSSEN, A.G. HAIDARIS, C.G. & HAIDARIS, P.J. (1993) *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infectious Immunology*, 61 (7), pp. 2886-2890.
- GIGLIOTTI, F. & WRIGHT, T.W. (2012) *Pneumocystis*: where does it live? *PLOS Pathogens*, 8 (11), pp. 1-3.
- GILL, V.J. EVANS, G. STOCK, F. PARRILLO, J.E. MASUR, H. & KOVACS, J.A. (1987) Detection of *Pneumocystis carinii* by fluorescent-antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 25 (10), pp. 1837-1840.

- GIUNTOLI, D.S. STRINGER, S.L. STRINGER, J.R. (1994) Extraordinarily low number of ribosomal RNA genes in *Pneumocystis carinii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41 (5), pp. 88S.
- GORDIN, F.M. SIMON, G.L. WOFSY, C.B. & MILLS, J. (1984) Adverse reaction to trimethoprim-sulfamethoxazole in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 100 (4), pp. 495-499.
- GOSEY, L.L. HOWARD, R.M. WITEBSKY, F.G. OGNIBENE, F.P. WU, T.C. GILL, V.J. & MACLOWRY, J.D. (1985) Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (5), pp. 803-807.
- GRASLAND, A. POUCHOT, J. MICHON, C. HERTIG, A. SIMONPOLI, A.M. VINCENEUX, P. (1997) Extrapulmonary and disseminated pneumocystosis in AIDS. A review of the literature. *Annales Medecine Interne (Paris)*, 148 (2), pp. 177-183.
- GREEN, H. PAUL, M. VIDAL, L. LEIBOVICI, L. (2007) Prophylaxis for *Pneumocystis* pneumonia (PcP) in non-HIV immunocompromised patients. *Cochrane Database Systems Review*, 18 (3), CD 005590.
- GROVER, S.A. COUPAL, L. SUISSA, S. SZENTVERI, T. FALUTZ, J. TSOUKAS, C. BATTISTA, R.N. GILMORE, N. (1992) The clinical utility of serum lactate dehydrogenase in diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia among hospitalized AIDS patients. *Clinical & Investigative Medicine*, 15 (3), pp. 309-317.
- GUO, F CHEN, Y. YANG, S. XIA, H. LI, X. TONG, Z. (2014) *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected and immunocompromised non-HIV infected patients: a retrospective study of two centers in China. *PLOS ONE*, 9 (7), pp. 1-8.
- GUPTA, R. MIRDHA, B.R. GULERIA, R. KUMAR, L. SAMANTARAY, J.C. AGARWAL, S.K. KABRA, S.K. LUTHRA, K. (2009) Diagnostic significance of nested polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64 (4), pp. 381-388.
- GUTIÉRREZ, S. RESPALDIZA, N. CAMPANO, E. MARTÍNEZ-RISQUEZ, M.T. CALDERÓN, E.J. & DE LA HORRA, C. (2011) *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonar disease. *Parasite*, 18 (2), pp. 121-126.
- HAIDARIS, P.J. WRIGHT, T.W. GIGLIOTTI, F. FALLON, M.A. WHITBECK, A.A. & HADARIS, C.G. (1993) In situ hybridization analisis of developmental stages of *Pneumocystis carinii* that are transcriptionally active for a major glycoprotein gene. *Molecular Microbiology*, 7 (5), pp. 647-656.

- HAUSER, P.M. BILLE, J. LASS-FLORL, C. GELTNER, C. FELDMESSER, M. LEVI, M. PATEL, H. MUGGIA, V. ALEXANDER, B. HUGHES, M. FOLLETT, S.A. CUI, X. LEUNG, F. MORGAN, G. MOODY, A. PERLIN, D.S. & DENNING, D.W. (2011) Multicenter, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* infection by use of a commercial real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (5), pp. 1872-1878.
- HAUSER, P.M. BLANC, D.S. BILLE, J. & FRANCIOLI, P. (1998) III. Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2), pp. 27-35.
- HAUSER, P.M. NAHIMANA, A. TAFPE, P. WEBER, R. FRANCIOLI, P. BILLE, J. & RABODONIRINA, M. (2010) Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. *Clinical Infections Diseases*, 51 (4), pp. e28-e33.
- HAY, J.W. OSMOND, D.H. JACOBSON, M.A. (1988) Projecting the medical cost of AIDS and ARC in the United States. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 1 (5), pp. 466-485.
- HELWEG-LARSEN, J. (2004) *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Danish Medical Bulletin*, 51 (3), pp. 251-273.
- HELWEG-LARSEN, J. JENSEN, J.S. DOHN, B. BENFIELD, T.L. & LUNDGREN, B. (2002) Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia – a case – control study. *BioMed Central Infectious Diseases*, 2 (28), pp. 1-6.
- HELWEG-LARSEN, J. JENSEN, J.S. LUNDGREN, B. (1997) Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by PCR on oral washes. *Lancet*, 350 (9088), pp. 1363.
- HOLTEN-ANDERSEN, W. & KOLMOS, H.J. (1989) Comparison of methenamina silver nitrate and giemsa stain for detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from HIV infected patients. *APMIS*, 97 (8), pp. 745-747.
- HUANG, L. (2011) Clinical and translational research in *Pneumocystis* and *Pneumocystis* pneumonia. *Parasite*, 18 (1), pp. 3-11.
- HUANG, L. BEARD, C.B. CREASMAN, J. LEVY, D. DUCHIN, J.S. LEE, S. PIENIAZEK, N. CARTER, J.L. DEL RIO, C. RIMLAND, D. & NAVIN, T.R. (2000) Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *Journal of Infectious Diseases*, 182 (4), pp. 1192-1198.

- HUANG, L. CATTAMANCHI, A. DAVIS, J.L. BOON, S. KOVACS, J. MESHNICK, S. MILLER, R.F., WALZER, P.D. WORODRIA, W. MASUR, H. ON BEHALF OF THE INTERNATIONAL HIV-ASSOCIATED OPPORTUNISTIC PNEUMONIAS (IHOP) STUDY & THE LUNG HIV STUDY. (2011) HIV-Associated *Pneumocystis pneumonia*. *Proceeding of the American Thoracic Society*, 8 (3), pp. 294-300.
- HUANG, L. CROTHERS, K. MORRIS, A.M. GRONER, G. FOX, M. TURNER, J.R. MERRIFIELD, C. EISER, S. ZUCCHI, P. & BEARD, C.B. (2003) *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, pp. 616S-617S.
- HUANG, L. MORRIS, A.M. BEARD, C.B. (2001) *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase mutations and treatment with sulfa or sulfone regimens: a proposal for standardized definitions for clinical evaluation. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, pp. 180S-181S.
- HUANG, L. MORRIS, A.M. LIMPER, A.H. BECK, J.M. & ON BEHALF OF THE ATS *PNEUMOCYSTIS* WORKSHOP PARTICIPANTS (2006) An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in *Pneumocystis pneumonia* (PCP). *Proceeding of the American Thoracic Society*, 3 (8), pp. 655-664.
- HUGGETT, J.F. TAYLOR, M.S. KOCJAN, G. EVANS, H.E. MORRIS-JONES, S. GANT, V. NOVAK, T. COSTELLO, A.M. ZUMLA, A. MILLER, R.F. (2008) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*, 63 (2), pp. 154-159.
- HUGHES, W.T. (1982) Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *Journal of Infectious Diseases*, 145 (6), pp. 842-848.
- HUGHES, W.T. (1994) Clinical manifestation in children. In: *Pneumocystis carinii pneumonia*, 2ª ed., Walzer P.D., New York, Marcel Dekker, pp. 319-329.
- HUGHES, W.T. (2001) *Pneumocystis carinii pneumonia*. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 12 (4), pp. 309-314.
- HUGHES, W.T. FELDMAN, S. CHAUDHARY, S.C. OSSI, M.J. COX, F. & SANYAL, S.K. (1978) Comparison of pentamidine isethionate and trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of *Pneumocystis carinii pneumonia*. *Journal of Pediatric*, 92 (2), pp. 285-291.
- HUGHES, W.T. KUHN, S. CHAUDHARY, S. FELDMAN, S. VERZOSA, M. AUR, R.J. PRATT, C. & GEORGE, S.L. (1977) Successful chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *The New England Journal of Medicine*, 297 (26), pp. 1419-1426.

- HUGHES, W.T. LEOUNG, G. KRAMER, F. BOZZETTE, S.A. SAFRIN, S. FRAME, P. CLUMECK, N. MASUR, H. LANCASTER, D. CHAN, C. LAVELLE, J. ROSENSTOCK, J. FALLOON, J. FEINBERG, J. LAFON, S. ROGERS, M. & SATTLER, F. (1993) Comparison of atovaquone (566C80) with trimethoprim-sulfamethoxazole to treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *The New England Journal of Medicine*, 328 (21), pp. 1521-1527.
- HUGHES, W.T. MCNABB, P.C. MAKRES, T.D. & FELDMAN, S. (1974) Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5 (3), pp. 289-293.
- HUGHES, W.T. PRICE, R.A. KIM, H.K. COBURN, T.P. GRIGSBY, D. FELDMAN, S. (1973) *Pneumocystis carinii* pneumonitis in children with malignancies. *Journal of Pediatrics*, 82 (3), pp. 404-415.
- ICENHOUR, C.R. REBHOLZ, S.L. COLLINS, M.S. & CUSHION, M.T. (2002) Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryotic Cell*, 1 (3), pp. 414-419.
- ISHIDA, T. MATSUI, Y. MATSUMURA, Y. & FURUTANI, M. (1994) Ultrastructural observation of *Pneumocystis carinii* bronchoalveolar lavage fluid from non-AIDS patients with *P. carinii* pneumonia. *Chest*, 105 (5), pp. 1342-1346.
- ITTARAT, I. ASAWAMAHASAKDA, W. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. & MESHNICK, S.R. (1995) Effects of atovaquone and other inhibitors on *Pneumocystis carinii* dihydroorotate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (2), pp. 325-328.
- IVÁDY, G. PÁLDY, L. (1958) A new method of treating interstitial plasma cell pneumonia in premature infant with 5-valent antimony & aromatic diamidines. *Monatsschr Kinderheilkd*, 106 (1), pp. 10-14.
- JARBOUI, M.A. SELLAMI, A. SELLAMI, H. CHEIKHROUHO, F. MAKNI, F. ARAB, N.B. JEMAA, M.B. & AYADI, A. (2009) Molecular diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in immunocompromised patients. *Mycoses*, 53 (4), pp. 329-333.
- JIANCHENG, W. MINJUN, H. YI-JUN, A. LAN, S. ZENGZHU, G. JIANRONG, S. XIXIONG, K. (2009) Screening *Pneumocystis carinii* pneumonia in non-HIV-infected immunocompromised patients using polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64 (4), pp. 396-401.
- JIROVEC, O. (1952) *Pneumocystis carinii*, the cause of interstitial plasmocellular pneumonia in neonates. *P. Csl. Hyg epid mikrob*, 1, 141.

- JULES-ELYSEE, K.M. STOVER, D.E. ZAMAN, M.B. BERNARD, E.M. & WHITE, D.A. (1990) Aerosolized pentamidine: effect on diagnosis and presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Annals of Internal Medicine*, 112 (10), pp. 750-757.
- KAGAWA, F.T. KIRSCH, C.M. YENOKIDA, G.G. LEVINE, M.L. (1988) Serum lactate dehydrogenase activity in patients with AIDS and *Pneumocystis carinii* pneumonia. An adjunct to diagnosis. *Chestjournal*, 94 (5), pp. 1031-1033.
- KAISER, K. RABODONIRINA, M. PICOT, S. (2001) Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii hominis*. *Journal of Microbiological Methods*, 45 (2), pp. 113-118.
- KAMBOJ, M. WEINSTOCK, D. & SEPKOWITZ, K.A. (2006) Progression of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients receiving echinocandin therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 43 (9), pp. e92-e94.
- KANESHIRO, E.S. & LIMPER, A.H. (2011) *Pneumocystis*. *Encyclopedia of Life Sciences*, (August), pp. 1-10.
- KANESHIRO, E.S. & MAIORANO, J.N. (1996) Survival and infectivity of *Pneumocystis carinii* outside the mammalian host. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43 (5), pp. 35S.
- KAPLAN, J.E. HANSON, D. DWORKIN, M.S. FREDERICK, T. BERTOLLI, J. LINDEGREN, M.L. HOLMBERG, S. & JONES, J.L. (2000) Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 30 (1), pp. 5S-14S.
- KARAM, M.B. & MOSADEGH, L. (2014) Extra-pulmonary *Pneumocystis jiroveci* infection: a case report. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 363, pp. 1-5.
- KAUR, N. & MAHL, T.C. (2007) *Pneumocystis jirovecii (carinii)* pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. *Diagnosis Diseases Sciences*, 52 (6), pp. 1481-1484.
- KAZANJIAN, P. ARMSTRONG, W. HOSSLER, P.A. BURMAN, W. RICHARDSON, J. LEE, C.H. CRANE, L. KATZ, J. & MESHNICK, S.R. (2000) *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *Journal of Infectious Diseases*, 182 (2), pp. 551-557.
- KAZANJIAN, P. LOCKE, A.B. HOSSLER, P.A. LANE, B.R. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. CANNON, M. & MESHNICK, S.R. (1998) *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS*, 12 (8), pp. 873-878.

- KEELY, S.P. & STRINGER, J.R. (1996) Multi-locus genotype switching in *Pneumocystis carinii* sp. f. *hominis*: evidence for reinfection. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43 (5), pp. 50S.
- KEELY, S.P. & STRINGER, J.R. (1997) Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (11), pp. 2745-2747.
- KETCHUM, M.A. FINKELMAN, M.A. REX, J.H. & OSTROSKY-ZEICHNER, L. (2004) (1→3)-β-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections. *Clinical Infectious Diseases*, 39 (2), pp. 199-205.
- KHODADADI, H. MIRHENDI, H. MOHEBALI, M. KORDBACHEH, P. ZARRINFAR, H. MAKIMURA, K. (2013) *Pneumocystis jirovecii* colonization in non-HIV-infected patients based on nested-PCR detection in bronchoalveolar lavage samples. *Iranian Journal of Public Health*, 42 (3), pp. 298-305.
- KHOT, P.D. FREDRICKS, D.N. (2009) PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 7 (10), pp. 1201-1221.
- KIM, S.J LEE, J. CHO, Y. PARK, Y.S. LEE, C.H. YOO, H.I. LEE, S. YIM, J. LEE, JH. YOO, C. LEE, C.T. KIM, Y.W. HAN, S.K. KIM, H.B. PARK, J.S. (2014) Prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients without HIV infection. *Journal of Infection*, 69 (1), pp. 88-95.
- KITADA, K. OKA, S. KIMURA, S. SHIMADA, K. & NAKAMURA, Y. (1991a) Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by 5S ribosomal DNA amplification. *Journal of Protozoology*, 38 (6), pp. 90S-91S.
- KITADA, K. OKA, S. KIMURA, S. SHIMADA, K. SERIKAWA, T. YAMADA, J. TSUNOO, H. EGAWA, K. & NAKAMURA, Y. (1991b) Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (9), pp. 1985-1990.
- KIRSCH, C.M. AZZI, R.L. YENOKIDA, G.G. & JENSEN, W.A. (1990) Analysis of induced sputum in the diagnosis of pneumonia. *American Journal of Medical Sciences*, 299 (6), pp. 386-391.
- KOFTERIDIS, D.P. VALACHIS, A. VELEGRAKI, M. ANTONIOU, M. CHRISTOFAKI, M. VRENTZOS, G.E. ANDRIANAKI, A.M. SAMONIS, G. (2014) Predisposing factors, clinical characteristics and outcome of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-negative patients. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20 (7), pp. 412-416.
- KONY, S.J. HANE, A.A. LAROUZÉ, B. SAMB, A. CISSOKO, S. SOW, P.S. SANÉ, M. MAYNART, M. DIOUF, G. MURRAY, J.F. & SIDAK RESEARCH GROUP

- (2000) CD4+ T-lymphocytopenia in HIV-seronegative patients from Dakar. *Journal of Infection*, 41 (2), pp. 167-171.
- KOVACS, J.A. GRILL, V.J. MESHNICK, S. MASUR, H. (2001) New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA*, 286 (19), pp. 2450-2460.
- KOVACS, J.A. HIEMENZ, J.W. MACHER, A.M. STOVER, D. MURRAY, H.W. SHELFHAMER, J. LANE, H.C. URMACHER, C. HONIG, C. LONGO, D.L. PARKER, M.M. NATASON, C. PARRILLO, J.E. FAUCI, A.S. PIZZO, P.A. & MASUR, H. (1984) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Annals of Internal Medicine*, 100 (5), pp. 663-671.
- KOVACS, J.A. NG, V.L. MASUR, H. LEOUNG, G. HADLEY, W.K. EVANS, G. LANE, H.C. OGNIBENE, F.P. SHELFHAMER, J. PARRILLO, J.E. & GILL, V.J. (1988) Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *The New England Journal of Medicine*, 318 (10), pp. 589-593.
- KOZIEL, H. EICHBAUM, Q. & KRUSKAL, B.A. (1998) Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation. *Journal of Clinical Investigation*, 102 (7), pp. 1332-1344.
- KUTTY, G. & KOVACS, J.A. (2003) A single-copy gene encodes Kex1, a serine endoprotease of *Pneumocystis jiroveci*. *Infection and Immunity*, 71 (1), pp. 571-574.
- LAAKKONEN, J. (1998) *Pneumocystis carinii* in wildlife. *International Journal for Parasitology*, 28 (2), pp. 241-252.
- LAAKKONEN, J. FISHER, R.N. & CASE, T.J. (2001) Pneumocystosis in wild small mammals from California. *Journal of Wildlife Diseases*, 37 (2), pp. 408-412.
- LAMAINERE, C.G. ROILIDES, E. HACKER, J. & MULLER, F.M.C. (2003) Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (3), pp. 172-185.
- LARSEN, H.H. MASUR, H. KOVACS, J.A. GILL, V.J. SILCOTT, V.A. KOGULAN, P. MAENZA, J. SMITH, M. LUCEY, D.R. & FISCHER, S.H. (2002) Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (2), pp. 490-494.
- LATOUCHE, S. ORTONA, E. MAZARS, E. MARGUTTI, P. TAMBURRINI, E. SIRACUSANO, A. GUYOT, K. NIGOU, M. & ROUX, P. (1997) Biodiversity of

Pneumocystis carinii hominis: typing with different DNA regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (2), pp. 383-387.

LAU, W.K. YOUNG, L.S. REMINGTON, J.S. (1976) *Pneumocystis carinii* pneumonia: diagnosis by examination of pulmonary secretions. *JAMA*, 236 (21), pp. 2399-2402.

LAUTENSCHLAGER, I. LYYTIKAINEN, O. JOKIPII, L. JOKIPII, A. MAICHE, A. RUUTU, T. TUKIAINEN, P. & RUUTU, P. (1996) Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (3), pp. 728-730.

LE GAL, S. DAMIANI, C. ROUILLÉ, A. GRALL, A. TRÉGUER, L. VIRMAUX, M. MOALIC, E. QUINIO, D. MOAL, M.C. BERTHOU, C. SALIOU, P. LE MEUR, Y. TOTET, A. & NEVEZ, G. (2012) A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (7), e62-e71.

LEE, S.A. (2006) A review of *Pneumocystis* pneumonia. *Journal of Pharmacy Practice*, 19 (1), pp. 5-9.

LEE, C.H. LU, J.J. BARTLETT, M.S. DURKIN, M.M. LIU, T.H. WANG, J. JIANG, B. & SMITH, J.W. (1993) Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (3), pp. 754-757.

LEIGH, T.R. KANGRO, H.O. GAZZARD, B.G. JEFFRIES, D.J. COLLINS, J.V. (1993a) DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. *Respiratory Medicine*, 87 (7), pp. 525-529.

LEIGH, T.R. MILLETT, M.J. JAMESON, B. COLLINS, J.V. (1993b) Serum titres of *Pneumocystis carinii* antibody in health care workers caring for patients with AIDS. *Thorax*, 48 (6), pp. 619-621.

LI, M.C. LEE, N.Y. LEE, C.C. LEE, H.C. CHANG, C.M. KO, W.C. (2014) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients: delayed diagnosis and poor outcomes in non-HIV-infected individuals. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47 (1), pp. 42-47.

LIMPER, A.H. OFFORD, K.P. SMITH, T.F. & MARTIN II, W.J. (1989) Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *American Review of Respiratory Disease*, 140 (5), pp. 1204-1209.

LINSEN, C.F. JACOBS, J.A. BECKERS, P. TEMPLETON, K.E. BAKKERS, J. KUIJPER, E.J. MELCHERS, W.J. DRENT, M. & VINK, C. (2006) Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis*

- jirovecii* in bronchoalveolar lavage fluid samples. *Journal of Medical Microbiology*, 55 (9), pp. 1229-1235.
- LOBO, M.L. ESTEVES, F. DE SOUSA, B. CARDOSO, F. CUSHION, M.T. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2013) Therapeutic potential of caspofungin combined with trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis pneumonia*: a pilot study in mice. *PLOS ONE*, 8 (8), pp. 1-7.
- LONG, E.G. SMITH, J.S. MEIER, J.L. (1986) Attachment of *Pneumocystis carinii* to rat pneumocytes. *Laboratory Investigation*, 54 (6), pp. 609-615.
- LOWE, D.M. RANGAKA, M.X. GORDON, F. JAMES, C.D. MILLER, R.F. (2013) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in tropical and low and middle income countries: a systematic review and meta-regression. *PLOS ONE*, 8 (8), pp. 1-16.
- LU, J.J. CHEN, C.H. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. & LEE, C.H. (1995) Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (10), pp. 2785-2788.
- LUNDGREN, B. ELVIN, K. ROTHMAN, L.P. LJUNGSTROM, I. LIDMAN, C. & LUNDGREN, J.D. (1997) Transmission of *Pneumocystis carinii* from patients to hospital staff. *Thorax*, 52 (5), pp. 422-424.
- MA, L. BORIO, L. MASUR, H. & KOVACS, J.A. (1999) *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *Journal of Infectious Diseases*, 180 (6), pp. 1969-1978.
- MA, L. IMAMICHI, H. SUKURA, A. & KOVACS, J.A. (2001) Genetic divergence of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in *Pneumocystis carinii* from 7 different host species. *Journal of Infectious Diseases*, 184 (10), pp. 1358-1362.
- MACFARLANE, J. & FINCH, R.G. (1985) *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Thorax*, 40 (8), pp. 561-570.
- MACKAY, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (3), pp. 190-212.
- MACTAGGART, L.R. WENGENACK, N.L. & RICHARDSON, S.E. (2012) Validation of the mycassay *Pneumocystis* kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, real-time PCR, or conventional PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (6), pp. 1856-1859.

- MAHER, N.H. VERMUND, S.H. WELSH, D.A. & UNNASCH, T.R. (2001) Development and characterization of a molecular viability assay for *Pneumocystis carinii* f sp *hominis*. *Journal of Infectious Diseases*, 183 (12), pp. 1825-1827.
- MAINI, R. HENDERSON, K.L. SHERIDAN, E.A. LAMAGNI, T. NICHOLS, G. DELPECH, V. & PHIN, N. (2013) Increasing *Pneumocystis* pneumonia, England, UK, 2000-2010. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (3), pp. 386-392.
- MARCHIORI, E. PEREIRA, G.S. MOREIRA, B.M. CAPONE, D. MORAES, H.P. (2001) Pneumocistose na síndrome da imunodeficiência adquirida: correlação da tomografia computadorizada de alta resolução com a anatomopatologia. *Radiologia Brasileira*, 34 (6), pp. 317-321.
- MARQUES, S. MARCELINO, P. BAPTISTA, A.M. ALDOMIRO, F. RIBEIRO, J. & MALHADO, J. (2002) *Pneumocystis carinii* pneumonia in diabetic patient. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 11 (8), pp. 441-444.
- MARTINEZ, A. ALIOUAT, E.M. STANDAERT-VITSE, A. WERKMEISTER, E. POTTIER, M. PINÇON, C. DEI-CAS, E. ALIOUAT-DENIS, C.M. (2011) Ploidy of cell-sorted trophic and cystic forms of *Pneumocystis carinii*. *PLOS ONE*, 6 (6), pp. 1-12.
- MASKELL, N.A. WAINE, D.J. LINDLEY, A. PEPPERELL, J.C.T. WAKEFIELD, A.E. MILLER, R.F. & DAVIES, R.J.O. (2003) Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax*, 58 (7), pp. 594-597.
- MASUR, H. KAPLAN, J.E. & HOLMES, K.K. (2002) Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons-2002. Recommendations of the United States Public Health Services and the Infectious Diseases Society of America. *Annals of Internal Medicine*, 137 (5 Pt 2), pp. 435-478.
- MATOS, O. (1999). Epidemiologia e diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Contribuição para a avaliação de técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico da pneumocistose. Tese de dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- MATOS, O. (2012) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Africa: impact and implications of highly sensitive diagnostic technologies. *North American Journal of Medical Sciences*, 4 (10), pp. 486-487.
- MATOS, O. & ESTEVES, F. (2010a) Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite*, 17 (3), pp. 219-232.

- MATOS, O. & ESTEVES, F. (2010b) *Pneumocystis jirovecii* multilocus gene sequencing findings and implications. *Future Microbiology*, 5 (8), pp. 1257-1267.
- MATOS, O. ÂNGELO, H. & ANTUNES, F. (2011) Protozoários oportunistas e *Pneumocystis jirovecii*. Em: ANTUNES, F. Manual sobre sida. 4^a ed. Portugal: Permanyer Portugal, pp. 150-152.
- MATOS, O. AZEVEDO, P. CALDEIRA, L. MENDES, A.C. ARAÚJO, A.T. FORTE, M. & ANTUNES, F. (1995) Estudo comparativo de três métodos morfológicos para diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PPc) em infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH). *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 2, pp. 135-138.
- MATOS, O. COSTA, M.C. CORREIA, I. MONTEIRO, P. MONTEIRO, M. SOARES, J. VIEIRA, J.R. BONNET, M. & ANTUNES, F. (2003a) *Pneumocystis jirovecii* carriage in portuguese immunocompetent patients: preliminar results. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 (6), pp. 647-648.
- MATOS, O. COSTA, M.C. CORREIA, I. MONTEIRO, P. VIEIRA, J.R. SOARES, J. BONNET, M. ESTEVES, F. & ANTUNES, F. (2006) Infecção por *Pneumocystis jirovecii* em imunocompetentes com patologia pulmonar, em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19 (2), pp. 121-126.
- MATOS, O. COSTA, M.C. LUNDGREN, B. CALDEIRA, L. AGUIAR, P. & ANTUNES, F. (2001) Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20 (8), pp. 573-575.
- MATOS, O. LEE, C.H. JIN, S. LI, B. COSTA, M.C. GONÇALVES, L. & ANTUNES, F. (2003b) *Pneumocystis jirovecii* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infection, Genetics and Evolution*, 3 (4), pp. 281-285.
- MATOS, O. LUNDGREN, B. CALDEIRA, L. MANSINHO, K. AGUIAR, P. FORTE, M. & ANTUNES, F. (1999) Evaluation of a nested PCR for Detection of *Pneumocystis carinii* in serum from immunocompromised patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46 (5), pp. 104S-105S.
- MATOS, O. LUNDGREN, B. CALDEIRA, L. MANSINHO, K. AGUIAR, P. FORTE, M. & ANTUNES, F. (2000) Evaluation of two nested polymerase chain reactions for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 6 (3), pp. 149-152.

- MATSUMURA, Y. ITO, Y. LINUMA, Y. YASUMA, K. YAMAMOTO, M. MATSUSHIMA, A. NAGAO, M. TAKAKURA, S. & ICHIYAMA, S. (2012) Quantitative real-time PCR and the (1→3)-β-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (6), pp. 591-597.
- MATSUMURA, Y. SHINDO, Y. LINUMA, Y. YAMAMOTO, M. SHIRANO, M. MATSUSHIMA, A. NAGAO, M. ITO, Y. TAKAKURA, S. HASEGAWA, Y. & ICHIYAMA, S. (2011) Clinical characteristics of *Pneumocystis* pneumonia in non-HIV patients and prognostic factors including microbiological genotypes. *BMC Infectious Diseases*, 11 (76), pp. 1-9.
- MATSUMOTO, Y. & YOSHIDA, Y. (1984) Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear division observed in precysts. *Journal of Protozoology*, 31 (3), pp. 420-428.
- MATSUMOTO, Y. & YOSHIDA, Y. (1986) Advances in *Pneumocystis* biology. *Parasitology Today*, 2 (5), pp. 137-142.
- MEDINA, I. MILLS, J. LEOUNG, G. HOPEWELL, P.C. LEE, B. MODIN, G. BENOWITZ, N. & WOFSY, C.B. (1990) Oral therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus trimethoprim-dapsone. *The New England Journal of Medicine*, 323 (12), pp. 776-782.
- MEDRANO, F.J. MONTES-CANO, M. CONDE, M. HORRA, C. RESPALDIZA, N. GASCH, A. PEREZ-LOZANO, M.J. VARELA, J.M. & CALDERON, E.J. (2005) *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (2), pp. 245-250.
- MEKINIAN, A. DURAND-JOLY, I. HATRON, P.Y. MORANNE, O. DENIS, G. DEICAS, E. MORELL-DUBOIS, S. LAMBERT, M. LAUNAY, D. DELHAES, L. HACHULLA, E. & QUEYREL, V. (2011) *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology*, 50 (3), pp. 569-577.
- MERALI, S. & CLARKSON, A.B (2004) S-adenosylmethionine and *Pneumocystis*. *FEMS Microbiology Letters*, 237 (2), pp. 179-186.
- MERALI, S. VARGAS, D. FRANKLIN, M. & CLARKSON, A.B (2000) S-adenosylmethionine and *Pneumocystis carinii*. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (20), pp. 14958-14963.
- MILLER, R.F. & HUANG, L. (2004) *Pneumocystis jirovecii* infection. *Thorax*, 59 (9), pp. 731-733.

- MILLER, R.F. AMBROSE, H.E. NOVELLI, V. & WAKEFIELD, A.E. (2002) Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4), pp. 1555-1557.
- MILLER, R.F. HUANG, L. & WALZER, P.D. (2013) *Pneumocystis* pneumonia associated with human immunodeficiency virus. *Clinics in Chest Medicine*, 34 (2), pp. 229-241.
- MILLER, R.F. KOCJAN, G. BUCKLAND, J. HOLTON, J. MALIN, A. & SEMPLE, S. (1991) Sputum induction for the diagnosis of pulmonary disease in HIV patients. *Journal of Infection*, 23 (1), pp. 5-15.
- MILLER, R.F. LINDLEY, A.R. COPAS, A. AMBROSE, H.E. DAVIES, R.J.O. & WAKEFIELD, A.E. (2005) Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain. *Thorax*, 60 (8), pp. 679-682.
- MILLER, R.F. & WAKEFIELD, A.E. (1996) *Pneumocystis carinii*: molecular taxonomy and epidemiology. *Journal of Medical Microbiology*, 45 (4), pp. 233-235.
- MILLS, J. (1986) *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* infection in patients with AIDS. *Reviews of Infectious Diseases*, 8 (6), pp. 1001-1011.
- MONNET, X. VIDAL-PETIOT, E. OSMAN, D. HAMZAOU, O. DURSBAACH, A. GOUJARD, C. MICELI, C. BOURÉE, P. & RICHARD, C. (2008) Critical care management and outcome of severe *Pneumocystis* pneumonia in patients with and without HIV infection. *Critical Care*, 12 (1), R28.
- MONTES-CANO, M.A. CHABE, M. FONTILLON-ALBERDI, M. HORRA, C. RESPALDIZA, N. MEDRANO, F.J. VARELA, J.M. DEI-CAS, E. & CALDERON, E.J. (2009) Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (1), pp. 125-127.
- MOREIRA, M.B. STEIDLE, L.J. FORTES, D.Y. FERNANDES, C. CODAGNONE, D. BUENO, G.C. (2010) Rendimento diagnóstico da broncoscopia flexível no Hospital Universitário – UFSC. *Pulmão RJ*, 19 (1-2), pp. 13-20.
- MORI, S. CHO, I. ICHIYASU, H. SUGIMOTO, M. (2008) Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in elderly patients with rheumatoid arthritis in Japan: a possible association between colonization and development of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia during low-dose MTX therapy. *Modern Rheumatology*, 18 (3), pp. 240-246.
- MORI, H. OHNO, Y. ITO, F. ENDO, J. YANASE, K. FUNAGUCHI, N. LA, B.L.B. & MINATOGUCHI, S. (2010) Polymerase chain reaction positivity of *Pneumocystis jirovecii* during primary lung cancer treatment. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 40 (7), pp. 658-662.

- MORI, S. & SUGIMOTO, M. (2012) *Pneumocystis jirovecii* infection: an emerging threat to patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51 (12), pp. 2120-2130.
- MORRIS, A. (2008) Is there anything new in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia? Changes in *P. jirovecii* pneumonia over the course of the AIDS epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (4), pp. 634-636.
- MORRIS, A. BEARD, C.B. HUANG, L. (2002) Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes and Infection*, 4 (1), pp. 95-103.
- MORRIS, A. KINGSLEY, L.A. GRONER, G. LEBEDEVA, I.P. BEARD, C.B. NORRIS, K.A. (2004a) Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. *AIDS*, 18 (5), pp. 793-798.
- MORRIS, A. LUNDGREN, J.D. MASUR, H. WALZER, P.D. HANSON, D.L. FREDERICK, T. HUANG, L. BEARD, C.B. & KAPLAN, J.E. (2004b) Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (10), pp. 1713-1720.
- MORRIS, A. & NORRIS, K.A. (2012) Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25 (2), pp. 297-636.
- MORRIS, A. SCIURBA, F.C. LEBEDEVA, I.P. GITHAIGA, A. ELLIOTT, W.M. HOGG, J.C. HUANG, L. & NORRIS, K.A. (2004c) Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170 (4), pp. 408-413.
- MORRIS, A. SCIURBA, F.C. & NORRIS, K.A. (2008a) *Pneumocystis*: A novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD*, 5 (1), pp. 43-51.
- MORRIS, A. WEI, K. AFSHAR, K. & HUANGS, L. (2008b) Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *Journal of Infectious Diseases*, 197 (1), pp. 10-17.
- MU, X.D. WANG, G.F. & SU, L. (2011) A clinical comparative study of polymerase chain reaction assay for diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in non-AIDS patients. *Chinese Medical Journal*, 124 (17), pp. 2683-2686.
- MUHLETHALER, K. BOGLI-STUBER, K. WASMER, S. GARNIER, C.V. DUMONT, P. RAUCH, A. MUHLEMANN, K. & GARZONI, C. (2012) Quantitative PCR to diagnose *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised non-HIV patients. *European Respiratory Journal*, 39 (4), pp. 971-978.
- MUNKSGAARD, B. (2004) *Pneumocystis jirovecii* (formerly *Pneumocystis carinii*). *American Journal of Transplantation*, 4 (10), pp. 135-141.

- MURRAY, J. (2005) Pulmonary complications of HIV-1 infection among adults living in Sub-Saharan Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, 9 (8), pp. 826-835.
- NAKAMURA Y. (1998) Molecular microbiology of *Pneumocystis carinii*. *Japan Journal of Medical Mycology*, 39 (2), pp. 91-98.
- NAVIN, T.R. RIMLAND, D. LENNOX, J.L. JERNIGAN, J. CETRON, M. HIGHTOWER, A. ROBERTS, J.M. & KAPLAN, J.E. (2000) Risk factors for community-acquired pneumonia among persons infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Infectious Disease*, 181 (1), pp. 158-164.
- NEUMANN, S. KRAUSE, S.W. MASCHMEYER, G. SCHIEL, X. VON LILIENFELD-TOAL, M. (2013) Primary prophylaxis of bacterial infections and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with hematological malignancies and solid tumors. *Annals of Hematology*, 92 (4), pp. 433-442.
- NEVEZ, G. CHABÉ, M. RABODONIRINA, M. VIRMAUX, M. DEI-CAS, E. HAUSER, P.M. & TOTET, A. (2008) Nosocomial *pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite*, 15 (3), pp. 359-365.
- NEVEZ, G. GUYOT, K. TOTET, A. RACCURT, C. & DEI-CAS, E. (2001) Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in an immunosuppressed HIV-negative patient: detection and typing of the fungus by PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 50 (2), pp. 198-200.
- NEVEZ, G. JOUNIEAUX, V. LINAS, M.D. GUYOT, K. LEOPHONTE, P. MASSIP, P. SCHMIT, J.L. SEGUELA, J.P. CAMUS, D. DEI-CAS, E. RACCURT, C. & MAZARS, E. (1997) High frequency of *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* colonization in HIV-negative patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44 (6), pp. 36S.
- NEVEZ, G. RACCURT, C. JOUNIEAUX, V. DEI-CAS, E. & MAZARS, E. (1999) Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS*, 13 (4), pp. 535-536.
- NG, V.L. GARTNER, I. WEYMOUTH, L.A. GOODMAN, C.D. HOPEWELL, P.C. & HADLEY, W.K. (1989) The use of mucolysed induced sputum for the identification of pulmonary pathogens associated with human immunodeficiency virus infection. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*, 113 (5), pp. 488-493.
- NG, V.L. VIRANI, N.A. CHAISSON, R.E. YAJKO, D.M. SPHAR, H.T. CABRIAN, K. ROLLINS, N. CHARACHE, P. KRIEGER, M. HADLEY, W.K. & HOPEWELL, P.C. (1990a) Rapid detection of *Pneumocystis carinii* using a direct fluorescent monoclonal antibody stain. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (10), pp. 2228-2233.

- NG, V. YAJKO, D. & HADLEY, W. (1997) Extrapulmonary pneumocistose. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (3), pp. 401-418.
- NG, V.L. YAJKO, D.M. MCPHAUL, L.W. GARTNER, I. BYFORD, B. GOODMAN, C.D. NASSOS, P.S. SANDERS, C.A. HOWES, E.L. LEOUNG, G. HOPEWELL, P.C. & HADLEY, W.K. (1990b) Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (5), pp. 975-979.
- NIELSEN, M.H. SETTNES, O.P. ALIOUAT, E.M. CAILLIEZ, J.C. & DEI-CAS, E. (1998) Different ultrastructural morphology of *Pneumocystis carinii* derived from mice, rats, and rabbits. *APMIS*, 106 (8), pp. 771-779.
- NORRIS, K.A & MORRIS, A. (2011) *Pneumocystis* infection and the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunology Respiratory*, 50 (2-3), pp. 175-180.
- NOWASEB, V. GAEB, E. FRACZEK, M.G. RICHARDSON, D. DENNING, D.W. (2014) Frequency of *Pneumocystis jirovecii* in sputum from HIV and TB patients in Namibia. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (3), pp. 349-357.
- OLSSON, M. ELVIN, K. LOFDAHL, S. & LINDER, E. (1993) Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (2), pp. 221-226.
- OLSSON, M. LIDMAN, C. LATOUCHE, S. BJORKMAN, A. ROUX, P. LINDER, E. & WAHLGREN, M. (1998) Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (6), pp. 1737-1740.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2012) [www]. Disponível em: <http://www.avert.org/hiv-aids-sub-saharan-africa.htm> [2/09/2014].
- ORLOVIC, D. KULARATNE, R. FERRAZ, V. & SMEGO JR. R.A. (2001) Dual pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis carinii* in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (2), pp. 289-294.
- PHAIR, J. MUNOZ, A. DETELS, R. KASLOW, R. RINALDO, C. SAAH, A. & THE MULTICENTER AIDS COHORT STUDY GROUP (1990) The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. *The New England Journal of Medicine*, 322 (3), pp. 161-165.
- PINCUS, P.S. SANDLER, M.A. NAUDE, G.E. KALLENBACH, J.M. ISAACSON, C. & ZWI, S. (1987) Multiple pulmonary cavities, an unusual complication of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *South African Medical Journal*, 72 (12), pp. 871-872.

- PONCE, C.A. GALLO, M. BUSTAMANTE, R. & VARGAS, S.L. (2010) *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (3), pp. 347-353.
- POWLES, M.A. MCFADDEN, D.C. PITTARELLI, L.A. & SCHMATZ, D.M. (1992) Mouse model for *Pneumocystis carinii* pneumonia that uses natural transmission to initiate infection. *Infection and Immunity*, 60 (4), pp. 1397-1400.
- PROCOP, G.W. HADDAD, S. QUINN, J. WILSON, M.L. HENSHAW, N.G. RELLER, L.B. ARTYMYSHYN, R.L. KATANIK, M.T. & WEINSTEIN, M.P. (2004) Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (7), pp. 3333-3335.
- QIAGEN (2004-2006) Critical factors for successful real-time PCR.
- QUIST, J. & HILL, A. (1995) Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. *Chest*, 108 (2), pp. 415-418.
- RABODONIRINA, M. RAFFENOT, D. COTTE, L. BOIBIEUX, A. MAYENÇON, M. BAYLE, G. PERST, F. RABATEL, F. TREPO, C. PEYRAMOND, D. & PIENS, M.A. (1997) Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (11), pp. 2748-2751.
- RADHI, S. ALEXANDER, T. UKWU, M. SALEH, S. & MORRIS, A. (2008) Outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia in hospitalized patients from 2000 through 2003. *BMC Infectious Diseases*, 8 (118), pp. 1-10.
- RAMASWAMY, G. JAGADHA, V. & TCHERTKOFF, V. (1985) Diffuse alveolar damage and interstitial fibrosis in acquired immunodeficiency syndrome patients without concurrent pulmonary infection. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*, 109 (5), pp. 408-412.
- RANI, N. REDDY, V. KUMAR, A. KUMAR, K. BABU, G. & RAO, D. (2000) Clinical profile of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV infected persons. *Indian Journal Tuberculosis*, 47, pp. 93-96.
- REDHEAD, S.A. CUSHION, M.T. FRENKEL, J.K. & STRINGER, J.R. (2006) *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 (1), pp. 2-11.
- REID, A.B. CHEN, S.C. & WORTH, L.J. (2011) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients: new risks and diagnostic tools. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24 (6), pp. 534-544.

- RIBES, J.A. LIMPER, A.H. ESPY, M.J. & SMITH, T.F. (1997) PCR detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (4), pp. 830-835.
- RIEBOLD, D. ENOH, D.O. KINGE, T.N. AKAM, W. BUMAH, M.K. RUSSOW, K. KLAMMT, S. LOEBERMANN, M. FRITZSCHE, C. EYONG, J.E. EPEL, G. KUNDT, G. HEMMER, C.J. & REISINGER, E.C. (2014) *Pneumocystis jirovecii* colonization in HIV-positive and HIV-negative subjects in Cameroon. *Tropical Medicine and International Health*, 19 (6), pp. 643-655.
- RIVERO, L. DE LA HORRA, C. MONTES-CANO, M.A. RODRÍGUEZ-HERRERA, A. RESPALDIZA, N. FRIAZA, V. MORILLA, R. GUTIÉRREZ, S. VARELA, J.M. MEDRANO, F.J. & CALDERÓN, E.J. (2008) *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (7), pp. 1116-1118.
- ROBBERTS, F.J. LIEBOWITZ, L.D. CHALKLEY, L.J. (2007) Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 58 (4), pp. 385-392.
- RODRIGUEZ, M. & FISHMAN, J.A. (2004) Prevention of infection due to *Pneumocystis spp.* in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (4), pp. 770-782.
- ROHNER, P. JACOMO, V. STUDER, R. SCHRENZEL, J. GRAF, J.D. (2009) Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection*, 37 (3), pp. 261-265.
- ROUX, A. GONZALEZ, F. ROUX, M. MEHRAD, M. MENOTTI, J. ZAHAR, J. TADROS, V. AZOULAY, E. BRILLET, P. & VINCENT, F. (2014) Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44 (5), pp. 185-198.
- ROUX, P. LAVRARD, I. POIROT, J.L. CHOUAID, C. DENIS, M. OLIVIER, J.L. NIGOU, M. & MILTGEN, M. (1994) Usefulness of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (9), pp. 2324-2326.
- RUFFOLO, J.J. CUSHION, M.T. & WALZER, P.D. (1989) Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Protozoology*, 36 (1), 53S-54S.
- SAITO, K. NAKAYAMADA, S. NAKANO, K. TOKUNAGA, M. TSUJIMURA, S. NAKATSUKA, K. ADACHI, T. & TANAKA, Y. (2004) Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in patients with connective tissue diseases: re-evaluation

of clinical features of *P. carinii* pneumonia in rheumatic diseases. *Rheumatology*, 43 (4), pp. 479-485.

SAMUEL, C.M. WHITELAW, A. CORCORAN, C. MORROW, B. HSIAO, N.Y. ZAMPOLI, M. & ZAR, H.J. (2011) Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected *Pneumocystis* pneumonia using real-time PCR: a prospective study. *BioMed Central Infectious Diseases*, 11 (329), pp. 1-6.

SANCHES, E.M. FERREIRO, L. ANDRADE, C.P. PACHECO, S.M. ALMEIDA, L.L. SPANAMBERG, A. WISSMANN, G. (2013) *Pneumocystis* sp. in bats evaluated by qPCR. *Journal de Mycologie Médicale*, 23 (1), pp. 47-52.

SANCHES, E.M. FERREIRO, L. ANDRADE, C.P. PACHECO, S.M. SANTURIO, J.M. ALMEIDA, L.L. SPANAMBERG, A. WISSMANN, G. (2012) Real-time PCR and nested-PCR assays for detection of *Pneumocystis* sp. in lung tissues of bats. *Acta Scientiae Veterinariae*, 40 (4), pp. 1-5.

SANNO, K. HATANAKA, N. YAMAGISHI, T. KAMEMURA, H. HIRANO, Y. KODAKA, N. MIURA, A. KITAHARA, A. SAWATA, T. HOSAKA, K. NAKAZAWA, I. (2007) *Pneumocystis* pneumonia in a patient with type 2 diabetes mellitus. *Japanese Society of Internal Medicine*, 46 (14), pp. 1131-1133.

SASSI, M. RIPAMONTI, C. MUELLER, N.J. YAZAKI, H. KUTTY, G. MA, L. HUBER, C. GOGINENI, E. OKA, S. GOTO, N. FEHR, T. GIANELLA, S. KONRAD, R. SING, A. & KOVACS, J.A. (2012) Outbreaks of *Pneumocystis* pneumonia in 2 renal transplant centres linked to a single strain of *Pneumocystis*: implications for transmission and virulence. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (10), pp. 1437-1444.

SCHMOLDT, S. SCHUHEGGER, R. WENDLER, T. HUBER, I. SOLLNER, H. HOGARDT, M. ARBOGAST, H. HEESEMANN, J. BADER, L. & SING, A. (2008) Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (3), pp. 966-971.

SEPKOWITZ, K.A. (2002) Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (8), pp. 1098-1107.

SEPKOWITZ, K.A. BROWN, A. TELZAK, E. GOTTLIEB, S. & ARMSTRONG, D. (1992) *Pneumocystis carinii* pneumonia among patients without AIDS at a cancer hospital. *JAMA*, 267 (6), pp. 832-837.

SEXTON, A. & HOWLETT, B. (2006) Parallels un fungal pathogenesis on plants and animals hosts. *Eukaryotic Cell*, 5 (12), pp. 1941-1949.

- SHEBL, F.M. ENGELS, E.A. GOEDERT, J.J. & CHATURVEDI, A.K. (2010) Pulmonary infections and risk of lung cancer among persons with AIDS. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 55 (3), pp. 375-379.
- SHINOHARA, T. YASUI, M. YAMADA, H. FUJIMORI, Y. & YAMAGISHI, K. (2013) *Pneumocystis* pneumonia during postoperative adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Oncological Medicine*, 2013, pp. 1-4.
- SINCLAIR, K. WAKEFIELD, A.E. BANERJI, S. & HOPKIN, J.M. (1991) *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45 (1), pp. 183-184.
- SING, A. GEIGER, A.M. HOGARDT, M. & HEESEMANN, J. (2001) *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (7), pp. 2717-2718.
- SING, A. ROGGENKAMP, A. AUTENRIETH, I.B. & HEESEMANN, J. (1999) *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (10), pp. 3409-3410.
- SING, A. TREBESIUS, K. ROGGENKAMP, A. RUSSMANN, H. TYBUS, K. PFAFF, F. BOGNER, J.R. EMMINGER, C. & HEESEMANN, J. (2000) Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patients groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (4), pp. 1461-1467.
- SINGER, C. ARMSTRONG, D. ROSEN, P.P. & SCHOTTENFELD, D. (1975) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a cluster of eleven cases. *Annals of Internal Medicine*, 82 (6), pp. 772-777.
- SINICCO, A. MAIELLO, A. RAITERI, R. SCIANDRA, M. DASSIO, G. ZAMPROGNA, C. MECOZZI, B. (1996) *Pneumocystis carinii* in a patient with pulmonary sarcoidosis and idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Thorax*, 51 (4), pp. 446-447.
- SIROTZKY, L. MEMOLI, V. ROBERTS, J.L. & LEWIS, E.J. (1978) Recurrent *Pneumocystis* pneumonia with normal chest roentgenograms. *JAMA*, 240 (14), pp. 1513-1515.
- SIVAM, S. SCIURBA, F.C. LUCHT, L.A. ZHANG, Y. DUNCAN, S.R. NORRIS, K.A. MORRIS, A. (2011) Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in lungs from colonized COPD patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71 (1), pp. 24-28.

- SKELLY, M. HOFFMAN, J. FABBRI, M. HOLZMAN, R.S. CLARKSON, A.B. MERALI, S. (2003) S-adenosylmethionine concentrations in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet*, 361 (9365), pp. 1267-1268.
- SMITH, J.W. & BARTLETT, M.S. (1991) Laboratory diagnosis of pneumocystosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 11 (4), pp. 957-975.
- SMITH, R.L. RIPPS, C.S. & LEWIS, M.L. (1988) Elevated lactate dehydrogenase values in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest*, 93 (5), pp. 987-992.
- SPEICH, R. OPRAVIL, M. WEBER, R. HESS, T. LUETHY, R. & RUSSI, E.W. (1992) Prospective evaluation of a prognostic score for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. *Chest*, 102 (4), pp. 1045-1048.
- STRATAKOS, G. KALOMENIDIS, I. PAPAS, V. MALAGARI, K. KOLLINTZA, A. ROUSSOS, C. ANAGNOSTOPOULOU, M. PANIARA, O. ZAKYNTINOS, S. & PAPIRIS, S.A. (2005) Cough and fever in a female with Crohn's disease receiving infliximab. *European Respiratory Journal*, 26 (2), pp. 354-357.
- STRINGER, J.R. (1996) *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly? *Clinical Microbiology Reviews*, 9 (4), pp. 489-498.
- STRINGER, J.R. (2002) *Pneumocystis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 292 (5-6), pp. 391-404.
- STRINGER, J.R. BEARD, C.B. MILLER, R.F. & WAKEFIELD, A.E. (2002) A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), pp. 891-896.
- STRINGER, J.R. CUSHION, M.T. & WAKEFIELD, A.E. (2001) New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48 (s1), pp. 184s-189s.
- STRINGER, S.L. GARBE, T. SUNKIN, S.M. & STRINGER, J.R. (1993) Genes encoding antigenic surface glycoproteins in *Pneumocystis* from humans. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40 (6), pp. 821-826.
- STRINGER, S.L. HUDSON, K. BLASÉ, M.A. WALZER, P.D. CUSHION, M.T. & STRINGER, J.R. (1989a) Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *Journal of Protozoology*, 36 (1), pp. 14S-16S.
- STRINGER, S.L. STRINGER, J.R. BLASE, M.A. WALZER, P.D. & CUSHION, M.T. (1989b) *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Experimental Parasitology*, 68 (4), pp. 450-461.

- STRINGER, J.R. & WALZER, P.D. (1996) Molecular biology and epidemiology of *Pneumocystis carinii* infection in AIDS. *AIDS*, 10 (6), pp. 561-571.
- STRUIJK, G.H. GIJSEN, A.F. YONG, S.L. ZWINDERMAN, A.H. GEERLINGS, S.E. LETTINGA, K.D. DER PANT, K. TEN BERGE, I. & BEMELMAN, F.J. (2011) Risk of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients long after renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26 (10), pp. 3391-3398.
- SUK, C.W. BAI, K.J. YU, M.C. HU, T.Y. (2014) Coinfection of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia and pulmonary tuberculosis in a non-HIV-infected patient. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 111 (3), pp. 1-2.
- SUMMAH, H. YING-GANG, Z. FALAGAS, M.E. VOULOUMANOU, E.K. & JIE-MING, Q. (2013) Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised patients: a meta-analysis. *Chinese Medical Journal*, 126 (10), pp. 1965-1973.
- TAKAHASHI, T. GOTO, M. ENDO, T. NAKAMURA, T. YUSA, N. SATO, N. & IWAMOTO, A. (2002) *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, 51 (7), pp. 611-614.
- TAMBURRINI, E. MENCARINI, P. DE LUCA, A. ANTINORI, A. VISCONTI, E. AMMASSARI, A. ORTONA, L. ORTONA, E. SIRACUSANO, A. & VICARI, G. (1993) Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (10), pp. 2788-2789.
- TAMBURRINI, E. MENCARINI, P. VISCONTI, E. ZOLFO, M. DE LUCA, A. SIRACUSANO, A. ORTONA, E. & WAKEFIELD, A.E. (1996) Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (6), pp. 1586-1588.
- THOMAS, C.F. & LIMPER, A.H. (2004) *Pneumocystis* pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, 350 (24), pp. 2487-2498.
- THOMAS, C.F. & LIMPER, A.H. (2007) Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nature Reviews Microbiology*, 5 (4), pp. 298-308.
- THOMAS, S. VIVANCOS, R. CORLESS, C. WOOD, G. BEECHING, N.J. BEADSWORTH, M.B. (2011) Increasing frequency of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients in the United Kingdom: clonal variability, clusters, and geographic location. *Clinical Infectious Diseases*, 53 (3), pp. 307-308.

- TO, K.K.W. HUNG, I.F.N. XU, T. PON, R.W.S. IP, W.C.T. LI, P.T.W. LI, C.P.Y. LAU, S.K.P. YAM, W.C. CHAN, K.H. YUEN, K.Y. (2013) Clinical significance of *Pneumocystis jiroveci* in patients with active tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75 (3), pp. 260-265.
- TOGASHI, Y. MASAGO, K. ITO, Y. SAKAMORI, Y. OKUDA, C. FUKUHARA, A. NAGAI, H. KIM, Y.H. MISHIMA, M. (2013) *Pneumocystis jiroveci* pneumonia and colonization in patients with advanced lung cancer. *Oncology Letters*, 5 (2), pp. 601-604.
- TOMA, E. THORNE, A. SINGER, J. RABOUD, J. LEMIEUX, C. TROTTIER, S. BERGERON, M.G. TSOUKAS, C. FALUTZ, J. LALONDE, R. GAUDREAU, C. THERRIEN, R. & CTN-PCP STUDY GROUP (1998) Clindamycin with primaquine vs. trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for mild and moderately severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS: a multicenter, double-blind, randomized trial (CTN 004). *Clinical Infectious Diseases*, 27 (3), pp. 524-530.
- TORRES, J. GOLDMAN, M. WHEAT, L.J. TANG, X. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. ALLEN, S.D. & LEE, C.H. (2000) Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. *Clinical Infectious Diseases*, 30 (1), pp. 141-145.
- TOSUN, I. BURUK, K. DEDE, R. KAKLIKKAYA, N. (2013) Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples of immunocompromised patients with PCR, IFA and giemsa staining methods. *Mikrobiyol*, 47 (1), pp. 195-197.
- TOUZE, J.E. HOVETTE, P.H. MARTET, G. (1991) Infections à *Pneumocystis carinii*. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 8100 A 10^a ed. Techniques, Paris: pp. 1-8.
- TRAJANO, A.L. LYRA, R.M. KALLÁS, E.G. ESGAIB, A.S. FERREIRA, S.M. GUIDUGLI, R. (1992) Frequência de colonização de secreção colhida em coto brônquico no intra-operatório de cirurgia torácica. *Journal Brasileiro de Pneumologia*, 18 (1), pp. 11.
- VAN DER MEER, G. & BRUG, S.L. (1942) Infection par *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 22, pp. 301.
- VANEK, J. (1951) Atypická (interstiální) pneumonie dětí vyvolaná *Pneumocystis carinii* (atypical interstitial pneumonia of infants produce by *Pneumocystis carinii*). *Casop Léč Cesk*, pp. 1121-1124.
- VARELA, J.M. MEDRANO, F.J. DEI-CAS, E. & CALDERÓN, E.J. (2011) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in AIDS patients. In: ZAJAC, V. Microbes, Viruses and Parasites in AIDS Process. Croatia: Intech, pp. 113-142.

- VARGAS, S.L. HUGHES, W.T. SANTOLAYA, M.E. ULLOA, A.V. PONCE, C.A. CABRERA, C.E. CUMSILLE, F. & GIGLIOTTI, F. (2001) Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clinical Infectious Disease*, 32 (6), pp. 855-861.
- VARGAS, S.L. HUGHES, W.T. WAKEFIELD, A.E. & OZ, H.S. (1995) Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *Journal of Infectious Disease*, 172 (2), pp. 506-510.
- VARGAS, S.L. PIZARRO, P. LÓPEZ-VIEYRA, M. NEIRA-AVILÉS, P. BUSTAMANTE, R. & PONCE, C.A. (2010) *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (3), pp. e19-21.
- VARGAS, S.L. PONCE, C.A. GIGLIOTTI, F. ULLOA, A.V. PRIETO, S. MUÑOZ, M.P. & HUGHES, W.T. (2000) Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (4), pp.1536-1538.
- VARGAS, S.L. PONCE, C.A. HUGHES, W.T. WAKEFIELD, A.E. WEITZ, J.C. DONOSO, S. ULLOA, A.V. MADRID, P. GOULD, S. LATORRE, J.J. AVILA, R. BENVENISTE, S. GALLO, M. BELLETTI, J. & LOPEZ, R. (1999) Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 29 (6), pp. 1489-1493.
- VARGAS, S.L. PONCE, C.A. LUCHSINGER, V. SILVA, C. GALLO, M. LOPEZ, R. BELLETTI, J. VELOZO, L. AVILA, R. PALOMINO, M.A. BENVENISTE, S. & AVENDANO, L.F. (2005) Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *Journal of Infectious Diseases*, 191 (1), pp. 122-126.
- VARGAS, S.L. PONCE, C.A. SANCHEZ, C.A. ULLOA, A.V. BUSTAMANTE, R. & JUAREZ, G. (2003) Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci*. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (5), pp. 605-606.
- VAVRA, J. & KUCERA, K. (1970) *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *Journal of Protozoology*, 17 (3), pp. 463-483.
- VAVRICKA, S.R. HALTER, J. HECHELHAMMER, L. HIMMELMANN (2004) *Pneumocystis carinii* pneumonia in chronic lymphocytic leukaemia. *Postgraduate Medical Journal*, 80 (942), pp. 236-238.
- VEDY, S. RAGOT, C. ROBET, Y. PUYHARDY, J. (2009) *Pneumocystis jiroveci*: mise à jour épidémiologique, physiopathologique et biologique. *Annales de Biologie Clinique*, 67 (4), pp. 369-379.

- VIDAL, S. DE LA HORRA, C. MARTIN, J. MONTES-CANO, M.A. RODRIGUEZ, E. RESPALDIZA, N. RODRIGUES, F. VARELA, J.M. MEDRANO, F.J. & CALDERÓN, E.J. (2006) *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with interstitial lung disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 12 (3), pp. 231-235.
- WAKEFIELD, A.E. (1994) Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41 (5), pp. 116S.
- WAKEFIELD, A.E. (1996) DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (7), pp. 1754-1759.
- WAKEFIELD, A.E. (1998a) I. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2), pp. 5-13.
- WAKEFIELD, A.E. (1998b) VI. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2), pp. 59-65.
- WAKEFIELD, A.E. (2002) *Pneumocystis carinii*. *British Medical Bulletin*, 61 (1), pp. 175-188.
- WAKEFIELD, A.E. LINDLEY, A.R. AMBROSE, H.E. DENIS, C.M. & MILLER, R.F. (2003) Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Infectious Diseases*, 187 (6), pp. 901-908.
- WAKEFIELD, A.E. MILLER, R.F. GUIVER, L.A. & HOPKIN, J.M. (1993) Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *International Journal of Medicine*, 86 (6), pp. 401-406.
- WAKEFIELD, A.E. PETERS, S.E. BANERJI, S. BRIDGE, P.D. HALL, G.S. HAWKSWORTH, D.L. GUIVER, L.A. ALLEN, A.G. & HOPKIN, J.M. (1992) *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Molecular Microbiology*, 6 (14), pp. 1903-1911.
- WAKEFIELD, A.E. PIXLEY, F.J. BANERJI, S. MILLER, R.F. MOXON, E.R. & HOPKIN, J.M. (1990a) Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*, 336 (8713), pp. 451-453.
- WAKEFIELD, A.E. PIXLEY, F.J. BANERJI, S. SINCLAIR, K. MILLER, R.F. MOXON, E.R. & HOPKIN, J.M. (1990b) Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43 (1), pp. 69-76.
- WAKEFIELD, A.E. STEWART, T.J. MOXON, E.R. MARSH, K. & HOPKIN, J.M. (1990c) Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 84 (6), pp. 800-802.

WALZER, P.D. (1999) Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. *Clinical and Vaccine Immunology*, 6 (2), pp. 149-155.

WALZER, P.D. (2002) Infecção por *Pneumocystis carinii* In: Medicina Interna, 15^a ed., Harrison, T., Ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, pp. 1253-1255.

WALZER, P.D. EVANS, H.E. COPAS, A.J. EDWARDS, S.G. GRANT, A.D. & MILLER, R.F. (2008) Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006. *Clinical Infectious Disease*, 46 (4), pp. 625-633.

WALZER, P.D. PEARL, D. KROGSTAN, D.J. RAWSON, P.G. & SCHULTZ, M.G. (1974) *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States: epidemiology, diagnostics and clinical features. *Annals of Internal Medicine*, 80 (1), pp. 83-93.

WALZER, P.D. SCHNELLE, V. ARMSTRONG, D. & ROSEN, P.P. (1977) Nude mouse: a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. *Science*, 197 (4299), pp. 177-179.

WAZIR, J.F. & ANSARI, N.A. (2004) *Pneumocystis carinii* infection-update and review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 128 (9), pp. 1023-1027.

WEIG, M. KLINKER, H. BOGNER, B.H. MEIER, A. & GROSS, U. (1997) Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patients groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (6), pp. 1445-1449.

WEINBERG, A. & DUARTE, M.I (1993) Respiratory complications in Brazilian patients infected with human immunodeficiency vírus. *Review Institute of Medicine Tropical São Paulo*, 35 (2), pp. 129-139.

WEVERLING, G.J. MOCROFT, A. LEDERGERBER, B. KIRK, O. GONZALES-LAHOZ, J. D'ARMINIO MONFORTE, A. PROENÇA, R. PHILLIPS, A.N. LUNDGREN, J.D. REISS, P. FOR THE EUROSIDA STUDY GROUP (1999) Discontinuation of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet*, 353 (9161), pp. 1293-1298.

WILSON, J.W. LIMPER, A.H. GRYS, T.E. KARRE, T. WENGENACK, N.L. BINNICKER, M.J. (2011) *Pneumocystis jirovecii* testing by real-time polymerase chain reaction and direct examination among immunocompetent and immunosuppressed patient groups and correlation to disease specificity. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69 (2), pp. 145-152.

- WISSMANN, G. MORILLA, R. FRIAZA, V. CALDERÓN, E. & VARELA, J.M. (2010) El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (1), pp. 38-43.
- WISSMANN, G. MORILLA, R. MARTÍN-GARRIDO, I. FRIAZA, V. RESPALDIZA, N. POVEDANO, J. PRAENA-FERNÁNDEZ, J.M. MONTES-CANO, M.A. MEDRANO, F.J. GOLDANI, L.Z. DE LA HORRA, C. VARELA, J.M. & CALDERÓN, E.J. (2011) *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. *European Journal of Clinical Investigation*, 41 (3), pp. 343-348.
- WISSMANN, G. VARELA, J.M. & CALDERÓN E.J. (2008) Prevention of *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease based on the detection of *Pneumocystis* colonization. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14 (12), pp. 1751-1752.
- WORTH, L.J. DOOLEY, M.J. SEYMOUR, J.F. MILESHKIN, L. SLAVIN, M.A. & THURSKY, K.A. (2005) An analysis of the utilization of chemoprophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with malignancy receiving corticosteroid therapy at a cancer hospital. *British Journal of Cancer*, 92 (5), pp. 867-872.
- WYDER, M. RASCH, E. & KANESHIRO, E. (1998) Quantification of absolute *Pneumocystis carinii* nuclear DNA content: trophic and cystic forms isolate from infected rat lungs are haploid organisms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45 (3), pp. 233-239.
- YALE, S.H. & LIMPER, A.H (1996) *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 71 (1), pp. 5-13.
- YONEDA, K. & WALZER, P.D. (1983) Attachment of *Pneumocystis carinii* to type I alveolar cells studied by freeze-fracture electron microscopy. *Infection and Immunity*, 40 (2), pp. 812-815.
- YOON, S.Y. KI, H.K. KIM, S.Y. CHO, Y.H. LEE, H.G. YOO, M.W. (2012) *Pneumocystis carinii* pneumonia in gastric cancer patients without acquired immune deficiency syndrome: 3 cases report and literature review. *Journal of the Korean Surgical Society*, 83 (1), pp. 50-55.
- YOSHIDA, Y. (1989) Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Protozoology*, 36 (1), pp. 53-60.
- YPMA-WONG, M.F. FONZI, W.A. & SYPHERD, P.S. (1992) Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infection and Immunity*, 60 (10), pp. 4140-4145.

ZAHAR, J.R. ROBIN, M. AZOULAY, E. FIEUX, F. NITENBERG, G. & SCHLEMMER, B. (2002) *Pneumocystis carinii* pneumonia in critically ill patients with malignancy: a descriptive study. *Clinical Infectious Diseases*, 35 (8), pp. 929-934.

ZAVALA, D.C. (1975) Diagnostic fiberoptic bronchoscopy: techniques and results of biopsy in 600 patients. *Chest*, 68 (1), pp. 12-19.

ZHANG, J. & STRINGER, J.R. (1993) Cloning and characterization of an alpha-tubulin-encoding gene from rat-derived *Pneumocystis carinii*. *Gene*, 123 (1), pp. 137-141.